

***De Novo-Design* und Strukturbestimmung von Inhibitoren
der tRNA-Guanin Transglykosylase aus *Zymomonas mobilis*
als neues Target der Bakterienruhr**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Ulrich Grädler

aus Halle/Westf.

Marburg/Lahn, im Juni 2000

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als Dissertation

angenommen am: 28.06.2000

Erstgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. M. Schlitzer

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 1997 bis Juni 2000 am Institut für pharmazeutische Chemie und Biochemie der Philipps-Universität in Marburg/Lahn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Klebe durchgeführt.

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
A	Adenosin
Å	Angstroem ($1 \cdot 10^{-10}$ Meter)
A_x	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
Abb.	Abbildung
ACD	<i>Available Chemical Directory</i>
Amp	Ampicillin
aqua demin.	deionisiertes Wasser
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat, analog zu CTP, GTP und TTP
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
cpm	„counts per minute“
d	Tag(e)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	„disintegrations per minute“
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Maßeinheit der Erdbeschleunigung
G	Guanin
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-(Hydroxyethyl)piperazin)-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-thio- β -galaktosid
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
LB	Luria-Bertani (Komplexmedium)

min	Minute(n)
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
preQ ₀	7-Cyano-7-deazaguanin
preQ ₁	7-Aminomethyl-7-deazaguanin
Q	Queuosin, 7-(4S,5R-Dihydroxy-2-cyclopenten-1S-yl-aminomethyl)-7-deazaguanosin
RMS	engl. root mean square, Definition siehe Kapitel 4.5.1
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGT	tRNA-Guanin Transglykosylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Uracil
u	Unit
u/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w.t.	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
<i>Z. mobilis</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
INHALTSVERZEICHNIS.....	7
1 EINLEITUNG.....	11
2 BIOLOGISCHES SYSTEM.....	12
2.1 BAKTERIENRUHR	12
2.2 VIRULENZMECHANISMUS VON <i>SHIGELLA FLEXNERI</i>	13
2.2.1 Invasion der Wirtszelle.....	13
2.2.2 Regulation der Virulenz.....	14
2.3 FUNKTION DER tRNA-GUANIN TRANSGLYKOSYLASE	17
2.3.1 Biosynthese von Queuosin.....	17
2.3.2 Erkennung und Modifikation von tRNA.....	18
2.4 STRUKTUR DER tRNA-GUANIN TRANSGLYKOSYLASE AUS <i>ZYMONOMAS MOBILIS</i>	19
2.4.1 Sekundärstruktur	19
2.4.2 Aktives Zentrum der <i>Z. mobilis</i> TGT	20
2.4.3 Katalytischer Mechanismus der <i>Z. mobilis</i> TGT	21
2.4.3 Bindung der tRNA	22
3 KENNTNISSTAND.....	23
3.1 INHIBITOREN DER TGT	23
3.1.1 Studien mit prokaryotischer TGT.....	23
3.1.2 Studien mit eukaryotischer TGT.....	25
3.2 STRUKTURBASIERTES DESIGN	26
3.2.1 Docking-Verfahren.....	26
3.2.2 De novo-Design.....	27
3.2.3 Scoring-Funktionen.....	28
3.3 AUFGABENSTELLUNG	30
4 MATERIAL UND METHODEN.....	32
4.1 BIOCHEMISCHE METHODEN.....	32
4.1.1 Chemikalien und Kits	32
4.1.2 Medien und Puffer.....	32
4.1.2.1 Medien	32
4.1.2.2 Puffer.....	33
4.1.3 Bakterienstämme und Plasmide	33
4.1.4 DNA-Präparation und Klonierungstechniken	34
4.1.4.1 Plasmid Midi-Präparation mit Nucleobond AX 100-Kit	34
4.1.4.2 Bestimmung des DNA-Gehalts	35

4.1.4.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen	35
4.1.4.4	Agarosegelelektrophorese	35
4.1.4.5	Isolierung von DNA-Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen	36
4.1.4.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen	36
4.1.4.7	DNA-Ligation	37
4.1.4.8	Transformation	37
4.1.4.9	Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR	37
4.1.5	DNA-Sequenzierung	38
4.1.6	tRNA ^{Tyr} -Präparation	39
4.1.6.1	In vitro-Transkription von tRNA ^{Tyr}	39
4.1.6.2	Reinigung von tRNA ^{Tyr}	40
4.1.6.3	Bestimmung des tRNA ^{Tyr} -Gehalts	40
4.1.7	Proteinchemische Methoden	40
4.1.7.1	Zellanzucht und Überexpression der <i>Z. mobilis</i> TGT in <i>E. coli</i>	40
4.1.7.2	Herstellung eines S100-Protein-Rohextraktes	41
4.1.7.3	Aufreinigung der TGT mittels Säulenchromatographie	41
4.1.7.4	Quantitative Proteinbestimmung	42
4.1.7.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
4.1.7.6	Silberfärbung von Proteingelen	43
4.1.7.7	Gelshift-Studien	44
4.1.8	Enzymassay der <i>Z. mobilis</i> TGT	44
4.1.8.1	Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max}	44
4.1.8.2	Bestimmung von K_i -Werten	46
4.2	PROTEINSTRUKTURAUFKLÄRUNG	48
4.2.1	Kristallisation der <i>Z. mobilis</i> TGT	48
4.2.2	Soaking von TGT-Kristallen mit Inhibitoren	50
4.2.3	Sammlung von Datensätzen	50
4.2.4	Verfeinerung der Datensätze	51
4.3	STRUKTURBESTIMMUNG VON KLEINEN ORGANISCHEN MOLEKÜLEN	53
4.3.1	Kristallisation	53
4.3.2	Datensammlung	53
4.3.3	Strukturlösung	53
4.4	GENERIERUNG VON 3D-STRUKTUREN	54
4.5	DOCKING-METHODEN	55
4.5.1	LUDI	55
4.5.2	FlexX	57
4.6	SCORING-VERFAHREN	59
4.6.1	Scoring-Funktion in LUDI und FlexX	59
4.6.2	DrugScore	60
4.7	DATENBANK-SUCHEN	62
4.8	INHIBITOR-SYNTHESE	64
4.8.1	Synthese von 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid	64
4.8.1.1	Synthese von 5-Nitronaphthalin-2,3-dicarbonsäure	64

4.8.1.2	Synthese von 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäure.....	65
4.8.1.3	Synthese von 5-(N-Acetylamino)-naphthalin-2,3-dicarbonsäureanhydrid.....	65
4.8.1.4	Synthese von 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid.....	66
4.8.2	Synthese von 4-Hydroxy-1(2H)-isochinolon-3-carbonsäureamid.....	67
4.9	MESSUNG VON pK_a -WERTEN.....	68
5	ERGEBNISSE.....	69
5.1	STUDIEN MIT MUTANTEN DER <i>Z. MOBILIS</i> TGT	69
5.1.1	Charakterisierung der S103A-Mutante der <i>Z. mobilis</i> TGT.....	69
5.1.1.1	Konstruktion und Reinigung von TGT(S103A)	70
5.1.1.2	Biochemische Charakterisierung von TGT(S103A).....	70
5.1.1.3	Kristallographische Charakterisierung von TGT(S103A)	72
5.1.2	Charakterisierung der Y106W-Mutante der <i>Z. mobilis</i> TGT.....	75
5.1.2.1	Konstruktion und Reinigung von TGT(Y106W).....	76
5.1.2.2	Biochemische Charakterisierung von TGT(Y106W)	78
5.1.2.3	Kristallographische Charakterisierung von TGT(Y106W).....	78
5.2	STRUKTURAUFKLÄRUNG DER <i>Z. MOBILIS</i> TGT IN KOMPLEX MIT SUBSTRAT-ANALOGA.....	82
5.3	ERSTER DESIGN-ZYKLUS: SUCHE VON LEITSTRUKTUREN MIT LUDI	86
5.3.1	Datenbanksuche mit LUDI.....	86
5.3.2	Kinetische Charakterisierung der Vorschläge	91
5.3.2.1	Test auf Inhibition	91
5.3.2.2	Kinetische Charakterisierung von 4-Aminophthalsäurehydrazid	93
5.3.3	Kristallographische Charakterisierung der Vorschläge	96
5.3.4	Kristallstruktur der TGT in Komplex mit 4-Aminophthalsäurehydrazid.....	98
5.4	ZWEITER DESIGN-ZYKLUS MIT 4-AMINOPHTHALSÄUREHYDRAZID ALS LEITSTRUKTUR	101
5.4.1	Analyse der Bindetasche	101
5.4.2	Datenbanksuche nach Phthalsäure-Derivaten.....	103
5.4.3	Bindungseigenschaften von Phthalsäureimiden und -hydraziden	106
5.4.3.1	Derivate von 4-Aminophthalsäurehydrazid.....	106
5.4.3.2	Derivate von 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid.....	111
5.4.3.3	Derivate von 3-Aminonaphthalin-1,8-dicarbonsäurehydrazid.....	114
5.5	DRITTER DESIGN-ZYKLUS.....	116
5.5.1	Datenbanksuche nach Thiolen als Leitstruktur-Substituenten	116
5.5.2	Generierung von Thiol-Derivaten der Leitstruktur	122
5.5.3	Docking und Bewertung von Leitstruktur-Derivaten.....	123
5.5.4	Bindungseigenschaften von Thiol-Derivaten der Leitstruktur.....	128
5.5.5	Struktur und Protonierungszustand von Thiol-Derivaten der Leitstruktur	136
5.5.5.1	pK_a -Wertbestimmungen	136
5.5.5.2	Struktur von 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid	137
5.6	VORSCHLÄGE FÜR WEITERE DESIGN-ZYKLEN	139
5.6.1	Suche nach Alizyklen mit Thiol-Gruppe	140
5.6.2	Docking und Bewertung der Vorschläge.....	141

6	DISKUSSION.....	143
6.1	STRUKTUR UND BIOCHEMIE VON MUTANTEN DER <i>Z. MOBILIS</i> TGT	143
6.1.1	<i>S103A-Mutante: Rückschlüsse auf den Enzymmechanismus.....</i>	<i>143</i>
6.1.2	<i>Y106W-Mutante: Entwicklung eines alternativen Fluoreszenz-Assays?.....</i>	<i>145</i>
6.2	SUBSTRATSPEZIFITÄT UND EIGENSCHAFTEN DER BINDETASCHE.....	148
6.3	<i>DE NOVO</i> -DESIGN MIT LUDI.....	150
6.4	BINDUNGSMODUS UND AKTIVITÄT VON LEITSTRUKTUR-DERIVATEN	155
6.4.1	<i>Zweiter Design-Zyklus.....</i>	<i>155</i>
6.4.2	<i>Dritter Design-Zyklus.....</i>	<i>158</i>
6.4.3	<i>Vorschläge für weitere Design-Zyklen</i>	<i>165</i>
6.5	THERAPEUTISCHES POTENTIAL DER TGT UND DER BISHERIGEN INHIBITOREN.....	168
6.6	AUSBLICK.....	172
7	ZUSAMMENFASSUNG	173
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	181
	DANKSAGUNGEN	194
	LEBENS LAUF	195

1 Einleitung

Die Entwicklung eines Arzneimittels bis zur Marktreife dauert im Durchschnitt 10 - 15 Jahre und erfordert 350 - 500 Millionen US-Dollar (Petsko, 1996). Viele pharmazeutische Wirkstoffe wurden durch einen glücklichen Zufall entdeckt, z.B. in mikrobiellen Extrakten oder Pflanzeninhaltsstoffen. Der Prozeß der Durchmusterung großer Substanzbibliotheken nach biologisch aktiven Verbindungen wird auch heute noch in der Pharmaforschung betrieben. Dazu werden Methoden der kombinatorischen Chemie und des Massenscreenings (high-throughput screening, HTS) angewendet (Houston & Banks, 1997). Durch die Etablierung der Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie stehen mittlerweile über 12.000 Proteinstrukturen (*Protein Data Bank*, Stand: Mai 2000)¹ zur Verfügung. Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Rahmen des „human genome project“ wird eine Vielzahl neuer Zielproteine mit pharmazeutischem Potential („targets“) zu erwarten sein (Burley *et al.*, 1999). Methoden zur Vorhersage bzw. Modellierung der Proteinstruktur aus der Aminosäure-Sequenz sind Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen (Westhead & Thornton, 1998). Gleichzeitig wird versucht, die strukturelle Information der Targets für das rationale Wirkstoff-Design zu nutzen. Die Entwicklung von computergestützten Methoden, die eine Suche und Bewertung von Leitstrukturen in einer virtuellen Substanz-Datenbanken („virtual screening“) ermöglichen, stellt dabei eine zunehmende Herausforderung in dieser noch jungen Forschungsdisziplin dar. Der Ansatz des strukturbasierten Wirkstoff-Designs hat bereits entscheidende Beiträge zur Entwicklung von Arzneistoffen geleistet, z.B. bei dem Carboanhydrase-Inhibitor Dorzolamid (Trusopt®) (Gubernator & Böhm, 1998) oder dem HIV-Protease-Inhibitor Saquinavir (Invirase®) (Greer *et al.*, 1994). Damit ergänzen sich die Methoden des high-throughput screenings und rationalen Wirkstoff-Designs mit dem Ziel, die Entwicklungszeit und die Kosten in der Arzneimittel-Forschung zu reduzieren.

In dieser Arbeit werden Methoden des computergestützten Designs von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) angewendet, einem neuen Target der Bakterienruhr. Dabei werden Vorschläge aus einer ersten Suche einer Substanz-Datenbank auf ihre biologische Wirksamkeit überprüft. Die experimentellen Ergebnisse sollen dann in die weiteren Schritte des Designs von Inhibitoren mit verbesserten Bindungseigenschaften einfließen.

¹ Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB

<http://www.rcsb.org/pdb/>

2 Biologisches System

2.1 Bakterienruhr

Bakterien des Typs *Shigella* (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* und *S. boydii*) sind als Erreger der Durchfallerkrankung Ruhr weltweit verbreitet (Rohde, 1984). Nach Angaben der WHO (World Health Organization) sterben jährlich etwa 600.000 Menschen, darunter meist Kleinkinder im Alter von 1 - 4 Jahren, an den Folgen dieser Erkrankung. In westlichen Industriestaaten liegt die Häufigkeit der Bakterienruhr bei etwa sieben Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern und Jahr, in den Entwicklungsländern liegt sie allerdings weit höher. Wie andere darmpathogene Bakterien werden Shigellen oral aufgenommen. Die Übertragung des Erregers erfolgt dabei hauptsächlich durch Schmierinfektion auf fäkal-oralem Wege aufgrund mangelnder Hygiene.

Die Spezies *S. flexneri* und *S. sonnei* verursachen weltweit die endemische Form der Bakterienruhr, während *S. dysenteriae* Typ I die epidemische Form der Krankheit auslöst. Aufgrund eines produzierten Exotoxins (Shigatoxin) ist die letztgenannte Spezies für weitaus schwerere Verläufe verantwortlich, häufig mit tödlichem Ausgang. Die minimale Infektionsdosis ist vergleichsweise gering, da bereits 10 bis 100 Bakterien eine Erkrankung auslösen. Im Vergleich dazu ist bei Salmonellen etwa die tausendfache Dosis nötig.

Die Symptome einer Ruhrerkrankung sind ein anfänglich flüssiger Durchfall (Diarrhöe) verbunden mit Fieber, starken Eingeweidekrämpfen und häufiger, mit Schleim, Eiter und Blut durchsetzter, flüssiger Stuhlgang (Dysenterie). Diese Krankheitssymptome klingen meist nach wenigen Tagen spontan ab. Bei einem Teil der infizierten Patienten können sich jedoch Komplikationen wie Bauchfellentzündungen, terminales Nierenversagen und allergische Gelenkentzündungen entwickeln (Butler, 1996).

Die Bakterienruhr wird in der Regel mit Antibiotika wie Azithromycin oder Ciprofloxacin behandelt, wobei Therapien häufig durch das Auftreten multiresistenter Stämme erschwert werden (Khan *et al.*, 1997). Ein Impfstoff zur Behandlung der Ruhrkrankheit steht noch nicht zur Verfügung. Die Entwicklung eines Lebendvakzinstamm befindet sich aber derzeit in der ersten klinischen Erprobungsphase (Dehio, 1998).

2.2 Virulenzmechanismus von *Shigella flexneri*

2.2.1 Invasion der Wirtszelle

Der Pathogenitätsmechanismus von Shigellen ist für die Spezies *Shigella flexneri* am eingehendsten untersucht worden (Menard *et al.*, 1996a). Nach oraler Aufnahme passieren die Bakterien den Magen und lösen durch Invasion der Dickdarmschleimhaut das eigentliche Krankheitsbild der Bakterienruhr aus. Die Invasion wird durch einen Entzündungsprozeß ermöglicht, der eine Migration des Erregers durch die intestinale Dickdarmmukosa auslöst (Zyklinsky *et al.*, 1992). Das Eindringen in die Wirtszelle des Kolonepithels erfolgt durch die Ausbildung von blütenartigen Membranausstülpungen an der Kontaktstelle, die über dem Bakterium verschmelzen und es in die Wirtszelle hineinziehen (Abb.1). Dieser Prozeß entspricht einer bakteriengelenkten Makropinozytose (Aufnahme von extrazellulärer Flüssigkeit in große Endosomen) und führt zu einer schnellen Vermehrung und Ausbreitung des Erregers gefolgt von dem Tod der Wirtszelle.

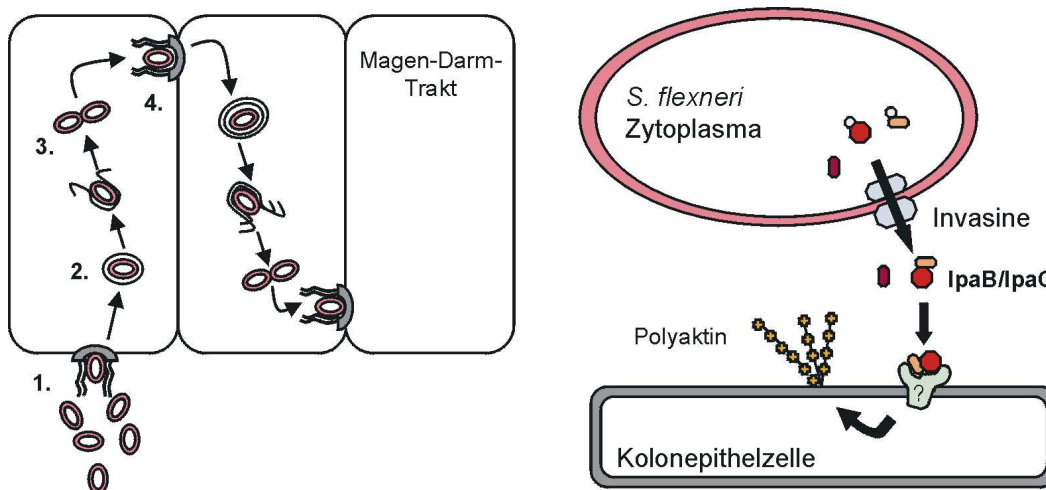


Abb. 1: Virulenzmechanismus von *Shigella flexneri*. Der Erreger (rosa) dringt durch bakteriengelenkte Makropinozytose in die Kolonepithelzellen des Magen-Darm-Traktes ein (1.). Dieser Prozeß wird durch Membranausstülpungen aus Polyaktin ermöglicht. Nach Aufnahme in die Wirtszelle befindet sich das Bakterium in einer Vakuole (2.), welche lysiert wird und den Erreger in das Zytosol entläßt, wo er sich rasch vermehren kann (3.). Die Ausbreitung in Nachbarzellen erfolgt analog durch Ausbildung von Membranausstülpungen (4.). An der Invasion sind virulenzspezifische Proteine (Invasine) beteiligt, die von einem 230 kb-Plasmid kodiert werden. Die Invasine werden bei Kontakt mit den Epithelzellen durch ein spezifisches Transportsystem (blau) exportiert. Ein Komplex der Invasine IpaB und IpaC löst über einen unbekannten Mechanismus (grün) die Aktinpolymerisation (gelbbraun) in der Wirtszelle aus.

Die Virulenzfaktoren sind auf einem 230 kb-Plasmid lokalisiert, welches sowohl für die invasionsspezifischen Proteine (Invasine IpaA-D) als auch für den Typ III-Sekretionsapparat dieser Invasine kodiert (Sansonetti *et al.*, 1982). Bei der Typ III-Sekretion werden Proteine ohne Prozessierung in die eukaryotische Zelle transferiert, was sowohl bei tier- als auch bei pflanzenpathogenen Bakterien gefunden wurde (Hueck, 1998). Nach Kontakt mit der Wirtszelle werden die Ipa-Proteine aus dem bakteriellen Zytoplasma exportiert (Abb. 1) und die Endozytose durch einen Komplex aus IpaB und IpaC über einen noch unbekannten Mechanismus ausgelöst (Menard *et al.*, 1996b). Die Induktion der Aktinpolymerisation erfolgt unter Beteiligung der GTPase Rho (Adam *et al.*, 1996) und der Protein-Tyrosinkinase Src (Dehio *et al.*, 1995). Dabei wirkt das Invasin IpaA einer unkontrollierten Polyaktin-Produktion entgegen, um den Invasionsprozeß zu steuern (Tran Van Nhieu *et al.*, 1997). Nach ihrer Aufnahme in die Epithelzelle befinden sich die Shigellen zunächst in einer phagosomalen Vakuole, die jedoch innerhalb weniger Minuten durch die Ipa-Proteine lysiert wird (High *et al.*, 1992). Der Erreger kann sich im nährstoffreichen Zytoplasma der Wirtszelle schnell vermehren und sich ohne erneutes extrazelluläres Stadium in benachbarte Epithelzellen ausbreiten (Bernardini *et al.*, 1989). Auf diese Weise sind die Shigellen vor der Immunantwort des Wirtes geschützt.

2.2.2 Regulation der Virulenz

Die Produktion der Virulenzfaktoren von *Shigella flexneri* wird durch ein komplexes System reguliert, an dem sowohl chromosomal- als auch Virulenzplasmid-kodierte Gene beteiligt sind. Das *virF*-Gen des 230 kb-Virulenzplasmides kodiert für einen positiven Transkriptionsfaktor (VirF), der wiederum die Expression der *virG*- und *virB*-Gene reguliert (Sakai *et al.*, 1986). Zur inter- und intrazellulären Ausbreitung der Shigellen in der Wirtszelle ist das Protein VirG erforderlich (Lett *et al.*, 1989). Dagegen ist VirB ein positiver Regulator für nahezu alle weiteren Gene des für die Invasine kodierenden *ipa*-Operons und für die Typ III-Translokone kodierenden *mxi*- und *spa*-Operons (Tobe *et al.*, 1991).

Es konnte eine Vielzahl chromosomaler Gene von *S. flexneri* identifiziert werden, die dem Bakterium eine Modulation der Pathogenität aufgrund verschiedener Umweltfaktoren (z.B. Temperatur, pH-Wert, Osmolarität) ermöglichen (Sasakawa, 1995). Durch Zufalls-Tn5-Insertions-Mutagenese des Chromosoms von *S. flexneri* und anschließende Pathogenitätsstudien konnte ein weiteres für die Virulenz verantwortliches Gen (*vacC*) identifiziert werden (Durand *et al.*, 1994). Das *vacC*-Gen ist nahezu identisch (> 98 % Sequenzhomologie) mit

dem *tgt*-Gen von *Escherichia coli*, welches für das zytoplasmatische Enzym tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT, EC 2.4.2.29) kodiert (Reuter *et al.*, 1991). Die *E. coli* TGT ist beteiligt an der Biosynthese (Kapitel 2.4.2) des hypermodifizierten tRNA-Nukleosids Queuosin (Q, 7-(4S,5R-Dihydroxy-2-cyclopenten-1S-yl-aminomethyl)-7-deazaguanosin, **5**, Abb. 2), das in der Antikodon-Schleife von tRNAs aller bisher untersuchten Organismen mit Ausnahme von Hefe und Archaeobakterien gefunden wurde (Slany & Kersten, 1994). Das Queuosin ersetzt bei der Modifikation das Guanosin (**1**, Abb. 2) in Position 34, der sogenannten Wobble-Position, in tRNAs mit der Antikodon-Sequenz GUN (N = eines der vier RNA-Nukleotide) (Harada & Nishimura, 1972). Diese tRNAs kodieren für die Aminosäuren Asp, Asn, His und Tyr. Obwohl bereits über 90 modifizierte RNA-Nukleoside gefunden wurden, sind die Mechanismen und Funktionen der Modifikationen in den meisten Fällen unbekannt (Garcia & Goodenough-Lashua, 1998). In Eukaryoten wird Queuosin mit der Nahrung aufgenommen und ist in unterschiedlichen zellulären Prozessen wie Differenzierung, Wachstum (Dirheimer *et al.*, 1995) oder metabolischer Regulation (Langgut *et al.*, 1993) involviert. Kürzlich wurde eine Beteiligung von Queuosin am ribosomalen Frameshift (Verschiebung des Leserahmens) von Retroviren (Carlson *et al.*, 1999) und Eukaryoten (Marczinke *et al.*, 2000) gefunden. Ein Q-Mangel in *E. coli* durch Mutation des *tgt*-Gens resultiert in einer höheren Fehlerrate bei der Erkennung des UAG Stop-Kodons (Frey *et al.*, 1989).

In der *vacC(tgt)*-Mutanten von *S. flexneri* wurde ein verminderter Gehalt der Invasine IpaB, IpaC und IpaD sowie der Regulatorproteine VirG und VirF gefunden, was zu einer signifikanten Abnahme der phänotypischen Virulenz führte (Durand *et al.*, 1994). Die Mutante zeigte gegenüber dem Wildtyp außerdem einen geringeren mRNA-Gehalt des korrespondierenden *ipaBCD*- und des *virG*-Operons, jedoch unveränderte mRNA-Gehalte für das *virF*-Operon. Durand *et al.* (1994) haben diese Befunde mit einer reduzierten Translationseffizienz der *virF* mRNA in der *vacC(tgt)*-Mutanten interpretiert. Analog zu anderen modifizierten Basen in der tRNA-Antikodon-Schleife scheint das Queuosin zur Feinabstimmung der Kodon-Antikodon-Wechselwirkung beizutragen (Bienz & Kubli, 1981).

Ein weiteres modifiziertes Nukleosid, das 2-Methylthio-N⁶-isopentyladenosin (ms²i⁶A), ist essentiell für die Virulenzgen-Expression in *S. flexneri* (Durand *et al.*, 1994). Das *miaA*-Gen kodiert für die tRNA N⁶-Isopentyladenosin (i⁶A37) Synthetase, welche im ersten Schritt der Modifikation eine Δ^2 -Isopentenylgruppe auf das Adenin in Position 37 überträgt (Björk, 1996). Die Mutation des *miaA*-Gens in allen vier *Shigella* Spezies resultiert in einer zehn- bis zwanzigfachen Reduktion der VirF-Proteinproduktion und damit in einer deutlich ver-

minderten Virulenz verglichen mit dem Wildtyp. Obwohl der Effekt der *tgt*-Mutation auf die Virulenzgenexpression in *Shigellae* geringer ausgeprägt ist (50 % VirF-Proteinanteil in Bezug auf den Wildtyp), zeigen die Phänotypen der *miaA*- und *tgt*-Mutanten im Pathogenitätsassay ein analoges Verhalten (Durand *et al.*, 1997).

Die Kenntnis der 3D-Struktur der tRNA-Guanin Transglykosylase (Kapitel 2.3) macht das Enzym zu einem interessanten Target für das rationale Design (Kapitel 3.2) von Inhibitoren gegen die Bakterienruhr.

2.3 Funktion der tRNA-Guanin Transglykosylase

2.3.1 Biosynthese von Queuosin

In Eukaryoten wird die hypermodifizierte Base Queuosin als Nahrungsfaktor aufgenommen und in einem Schritt in tRNAs mit der Antikodon-Sequenz GUN eingebaut (Kirtland *et al.*, 1988). Die Queuosin-34-tRNA wird in diesen Organismen durch Glykosylierung des 2,3-Epoxy-4,5-dihydroxy-cyclopentan-Restes von Queuosin mit Mannose (tRNA^{Asp}) bzw. Galaktose (tRNA^{Tyr}) weiter modifiziert (Kasai *et al.*, 1976).

Queuosin ist im Unterschied zur eukaryotischen TGT kein Substrat des bakteriellen Enzyms (Okada & Nishimura, 1979). Prokaryoten synthetisieren Queuosin *de novo* ausgehend von freiem Guanin (**1**, Abb. 2), das in einer unbekannten Reaktionsfolge in 7-Aminomethyl-7-deazaguanin (preQ₁, **3**) umgewandelt wird (Kuchino *et al.*, 1976). Dabei wird das C8- und N7-Atom von Guanin im Verlauf der Biosynthese ersetzt. In tRNA von Q-Mutanten aus *E. coli* konnte 7-Cyano-7-deazaguanin (preQ₀, **2**) gefunden werden, wobei unklar ist, ob preQ₀ eine Vorstufe von preQ₁ oder ein Nebenprodukt des Stoffwechsels des Mutanten-Stammes ist (Noguchi *et al.*, 1978). Die weiteren Modifikationen finden auf tRNA-Ebene statt und das preQ₁ wird, katalysiert von der TGT, zunächst gegen das Guanin-34 des tRNA-Antikodons ausgetauscht (Okada & Nishimura, 1979). Im nächsten Schritt erfolgt die Kupplung eines 2,3-Epoxy-4,5-dihydroxycyclopentan-Restes an die aliphatische Aminogruppe des preQ₁ durch einen unbekannten Mechanismus und es entsteht das Epoxy-Queuosin (oQ, **4**). Diese Reaktion wird von dem Genprodukt des *queA*-Gens, der S-Adenosyl-methionin:tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase katalysiert, wobei das S-Adenosylmethionin der Kofaktor ist (Slany *et al.*, 1993). Im letzten Schritt wird die oQ-tRNA von einem unbekannten, Vitamin B₁₂-abhängigen Enzym zu Q-tRNA (**5**) reduziert (Frey *et al.*, 1988).

Weder die prokaryotische noch die eukaryotische TGT verwenden einen Kofaktor oder ein energiereiches Kosubstrat bei der Basenaustausch-Reaktion.

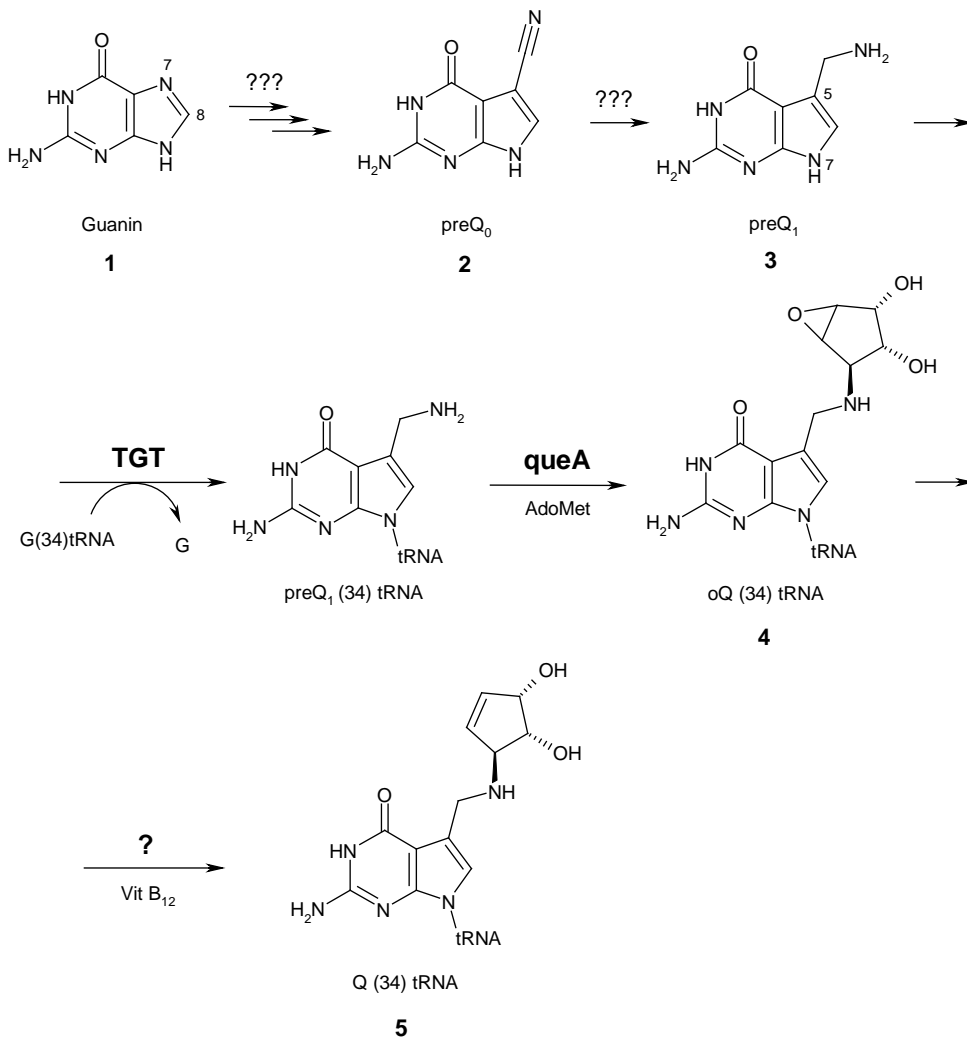


Abb. 2: Biosynthese der Queuosin (34) tRNA in Prokaryoten ausgehend von Guanin (1). PreQ₀, 7-Cyano-7-deazaguanin (2); preQ₁, 7-Aminomethyl-7-deazaguanin (3); oQ, Epoxy-Queuosin (4); Q, 7-(4S,5R-Dihydroxy-2-cyclopenten-1S-yl-aminomethyl)-7-deazaguanosin (5); SAM, S-Adenosyl-methionin.

2.3.2 Erkennung und Modifikation von tRNA

Prokaryotische und eukaryotische TGT erkennen die U₃₃G₃₄U₃₅-Sequenz der tRNA-Antikodon-Schleife (Nakanishi *et al.*, 1994; Curnow & Garcia, 1995), jedoch gibt es Unterschiede bei der Bindung der tRNA. Die eukaryotische TGT benötigt zur spezifischen Erkennung die komplette tRNA-Sequenz (Grosjean *et al.*, 1996), die *E. coli* TGT bindet dagegen *in vitro* ein synthetisches 17 bp-RNA-Fragment (Curnow *et al.*, 1993). Dieses Oligoribonukleotid enthält die UGU-Sequenz und ein helikales Motiv („hairpin-Struktur“) (Curnow & Garcia, 1995).

2.4 Struktur der tRNA-Guanin Transglykosylase aus *Zymomonas mobilis*

2.4.1 Sekundärstruktur

Prokaryotische tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT, EC 2.4.2.29) wurde erstmals aus *Escherichia coli* isoliert (Okada & Nishimura, 1979) und das entsprechende Gen kloniert (Reuter et al., 1991). Aufgrund der Neigung der *E. coli* TGT in konzentrierten Lösungen zu oligomerisieren (Garcia et al., 1993) wurde zur Kristallisation die klonierte *Zymomonas mobilis* TGT verwendet, welche in Lösung eindeutig als Monomer vorliegt (Reuter & Ficner, 1995). Die Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT wurde bei einer Auflösung von 1,85 Å bestimmt (Romier et al., 1996b) und zeigt eine irreguläre $(\beta/\alpha)_8$ -Faßstruktur (Reardon & Farber, 1995) mit einer C-terminalen Zink-Bindungsdomäne. Das Zink-Bindungsmotiv ist in allen bekannten TGTs konserviert (Romier et al., 1997) und besteht aus drei Cystein- und einem Histidin-Rest, die das Zinkion tetraedrisch koordinieren. Der N-Terminus enthält ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt, welches das $(\beta/\alpha)_8$ -Faß von einer Seite verschließt (Abb. 3).

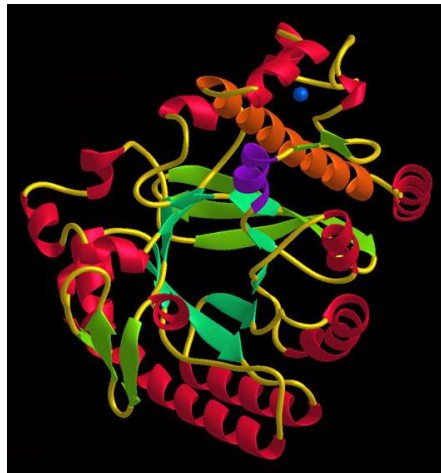


Abb. 3: Sekundärstruktur der tRNA-Guanin Transglykosylase. Jeweils acht β -Stränge (grün) bzw. α -Helices (rot) bilden eine irreguläre $(\beta/\alpha)_8$ -Faßstruktur, die auf einer Seite durch ein N-terminales dreisträngiges β -Faltblatt geschlossen wird. Am C-Terminus ist ein Zinkatom (blau) gebunden, das die Struktur stabilisiert (mit freundlicher Genehmigung von K. Reuter & R. Ficner).

Die Sequenzanalysen von eukaryotischen und archaebakteriellen TGTs lassen auf ein homologes Faltungsmuster schließen (Romier et al., 1997).

2.4.2 Aktives Zentrum der *Z. mobilis* TGT

Das Substrat preQ₁ (**3**) konnte in Kristalle der *Z. mobilis* TGT eindiffundiert („gesoakt“) und die Struktur des TGT-preQ₁-Komplexes bei einer Auflösung von 2,2 Å bestimmt werden (Romier et al., 1996b). Das preQ₁ ist in einer amphiphilen Bindungstasche interkaliert, die sich in der Öffnung des (β/α)₈-Fasses befindet, zu der die C-Termini der acht Stränge des β-Faltblattes zeigen. In der apo-Form des Enzyms ist der Hydroxyphenyl-Ring von Tyr¹⁰⁶ über eine Wasserstoffbrücke zur Carboxylatgruppe von Asp¹⁵⁶ orientiert und erst durch Insertion des preQ₁ wird die Bindungstasche ausgebildet (Abb. 4). Dabei erfolgen hydrophobe Wechselwirkungen der planaren 7-Deazaguanin-Base in der holo-Form zu den Seitengruppen von Tyr¹⁰⁶ (π-π-Stapelung), Cys¹⁵⁸ und Met²⁶⁰. Die funktionellen Gruppen des preQ₁ werden durch Wasserstoffbrücken zu Seitengruppen des Proteins spezifisch erkannt. Diese H-Brücken liegen zwischen folgenden Resten vor: der 3-NH- bzw. 2-NH₂-Gruppe und der Carboxylatgruppe von Asp¹⁵⁶, dem O4-Atom und dem Amid-Stickstoff von Gly²³⁰ bzw. der NH₂-Gruppe von Gln²⁰³, der exozyklischen Methylenamino-Gruppe und dem Carbonylsauerstoff von Leu²³¹ (Romier et al., 1996b).

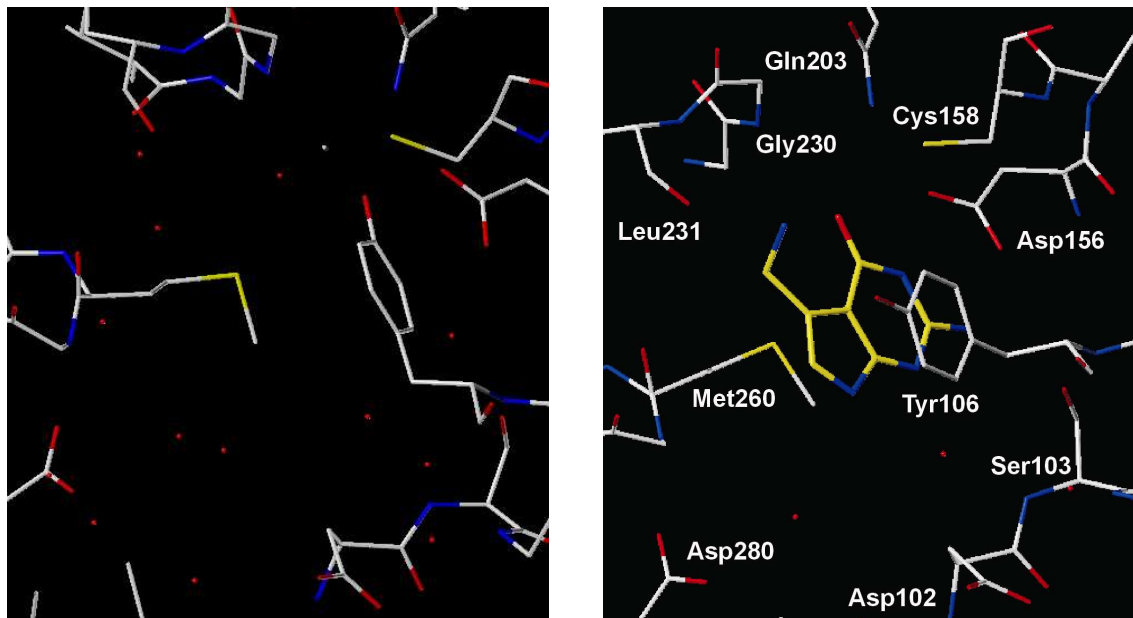


Abb. 4: Aktives Zentrum der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit preQ₁ (**3**). (a) In der apo-Form des Enzyms ist der Hydroxyphenyl-Ring von Tyr¹⁰⁶ über eine H-Brücke zu Asp¹⁵⁶ gebunden (links). (b) Durch spezifische Bindung von preQ₁ (gelb) erfolgt eine Konformationsänderung von Tyr¹⁰⁶ und die Bindungstasche wird ausgebildet. H-Brücken liegen zwischen preQ₁ und den Aminosäuren Asp¹⁵⁶, Gln²⁰³, Gly²³⁰ und Leu²³¹ vor (rechts).

Analoge Bindungsmotive, bestehend aus einer NH- und einer benachbarten exozyklischen NH₂-Gruppe des Liganden und einem Carboxylat-Rest des Proteins oder einer Carbonylgruppe (O4-Atom) des Liganden und einem Amid des Proteins, werden oft in Enzymen gefunden, die Guanin, GTP und Pterine binden (Kjeldgaard *et al.*, 1996).

2.4.3 Katalytischer Mechanismus der *Z. mobilis* TGT

Die Kristallstruktur von Queuosinmonophosphat (Yokoyama *et al.*, 1979) zeigt analog zu Guanosin eine β -Konfiguration an der Ribose. Die beobachtete Retention der Konfiguration wurde plausibel durch einen Mechanismus beschrieben, nach dem der Basenaustausch in zwei konsekutiven S_N2-Reaktionen über einen intermediären tRNA/TGT-Komplex verläuft (Romier *et al.*, 1996c). Diese kovalente Zwischenstufe konnte anhand eines Gelshift-Experimentes nachgewiesen werden, wobei die Natur dieses Komplexes nicht bekannt ist. Durch ortsspezifische Mutagenese von Aminosäure-Resten im aktiven Zentrum und anschließende kristallographische und biochemische Studien konnte die Carboxylatgruppe von Asp¹⁰² als aktives Nukleophil identifiziert werden (Romier *et al.*, 1996c). Obwohl Aspartate als schwächer nukleophil eingestuft werden als Serin-, Cystein- oder Histidin-Reste, werden analoge Enzymmechanismen häufiger gefunden (McMartin & Bohacek, 1997). In der 2-Deoxyribosyltransferase wurde ebenfalls ein kovalenter tRNA/Enzym-Komplex und ein Carboxylat als aktives Nukleophil nachgewiesen (Short *et al.*, 1996).

Der katalytische Basenaustausch wurde daher wie folgt postuliert (Abb. 49, Kapitel 6.1.1) (Romier *et al.*, 1996c): (1) nukleophiler Angriff der Carboxylatgruppe von Asp¹⁰² am C1'-Atom des Guanosin-34 der tRNA; (2) Ausbildung eines kovalenten tRNA/TGT-Komplexes zwischen der Carboxylatgruppe von Asp¹⁰² und der Ribose in α -Konfiguration; (3) nukleophiler Angriff des N7-Atoms von preQ₁ am C1'-Atom der Ribose unter Ausbildung der preQ₁(34)tRNA. Es konnte gezeigt werden, daß der v_{max}-Wert der *E. coli* TGT mit dem pK_a-Wert des N7-Stickstoffs von substituierten preQ₁-Derivaten korreliert. Der nukleophile Angriff von preQ₁ wird wahrscheinlich durch eine Deprotonierung an der N7-Position gefördert (Hoops *et al.*, 1995b). Die Ausbildung eines intermediären Riboxocarbenium-Ions, wie in anderen N-Ribohydrolasen und -transferasen beobachtet, kann allerdings ebenfalls diskutiert werden (Schramm, 1997).

Eine schwache Wasserstoffbrücke (3,5 Å) liegt zwischen der exozyklischen NH₂-Gruppe des preQ₁ und der Seitengruppe von Ser¹⁰³ vor. Es wurde beobachtet, daß die Aktivität der *E. coli* TGT durch Mutation dieses Serins in einen Alanin-Rest signifikant reduziert wird (Reuter *et*

al., 1994). Aufgrund des großen Abstandes ($\sim 7 \text{ \AA}$) zu dem N7-Atom von preQ₁ konnte Ser¹⁰³ als aktives Nukleophil ausgeschlossen werden und der Aktivitätsverlust der Ser-Ala-Mutanten wurde mit einer strukturellen Beteiligung von Ser¹⁰³ an der Katalyse interpretiert (Romier et al., 1996b).

2.4.3 Bindung der tRNA

Die elektrostatische Oberfläche der *Z. mobilis* TGT zeigt eine negativ geladene Region im C-terminalen Bereich des $(\beta/\alpha)_8$ -Fasses und eine großflächige positive Ladungsverteilung nahe der Zink-Bindungsstelle (Romier et al., 1996b). Die bipolare Verteilung der Oberflächenladung zeigt ein komplementäres Muster zu der 3D-Struktur der tRNA^{Asp}, die aus der Kristallstruktur des tRNA^{Asp}/Aspartyl-tRNA-Synthetase-Komplexes (Ruff et al., 1991) entnommen wurde (Abb. 5). In dem modellierten tRNA^{Asp}/TGT-Komplex wird das negativ geladene Zucker-Phosphat-Gerüst der tRNA durch die positive Oberflächenladung im Bereich der Zink-Bindungsdomäne stabilisiert. Die Basen des Antikodons, darunter das Guanin-34, interagieren in diesem Modell mit negativ geladenen Regionen im Zentrum des $(\beta/\alpha)_8$ -Fasses und somit im Bereich der preQ₁-Bindungstasche.

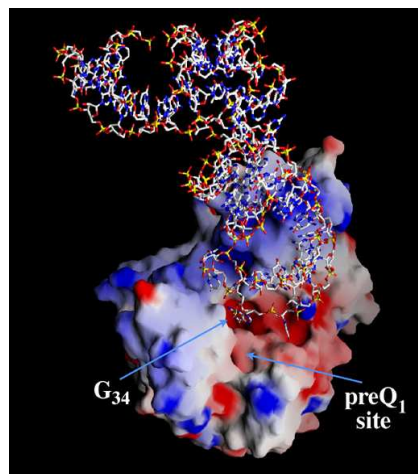


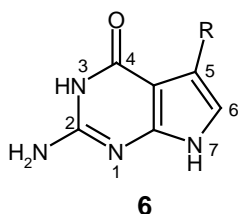
Abb. 5: Postuliertes Modell des Komplexes zwischen der *Z. mobilis* TGT und einem tRNA^{Asp}-Molekül. Die Oberflächenladungen der TGT sind farblich dargestellt (blau: positiv, rot: negativ) und zeigen eine bipolare Verteilung. Das Zucker-Phosphat-Gerüst der tRNA wird von positiven Ladungen im Bereich der Zink-Bindungsstelle stabilisiert. Die Basen der Antikodon-Schleife (z.B. Guanin-34) werden im Zentrum des $(\beta/\alpha)_8$ -Fasses durch negative Ladungen gebunden. (mit freundlicher Genehmigung von K. Reuter & R. Ficner)

3 Kenntnisstand

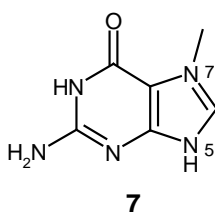
3.1 Inhibitoren der TGT

3.1.1 Studien mit prokaryotischer TGT

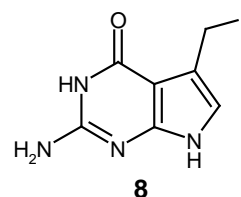
In einer Studie wurde die Substratspezifität der *E. coli* TGT gegenüber einer Reihe von Guanin- und Deazaguanin-Derivaten untersucht (Hoops et al., 1995b). Die apparenten Inhibitionskonstanten (K_i -Werte) wurden aus der Einbaurate von [^{14}C]-Guanin in unfractionierte Hefe-tRNA ermittelt. Das Enzym zeigte eine Toleranz gegenüber relativ kleinen Substituenten ($\text{R} = \text{H}$, CN , Me , CH_2NH_2 , CH_2OH , CONH_2) an der 5-Position des 2-Amino-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on-Gerüsts (**6**). Die aufgeführten Verbindungen können über ihre freie 7-NH-Gruppe an Position 34 der tRNA eingebaut werden und sind daher präziser als kompetitive Substrate zu bezeichnen (Hoops et al., 1995b). In diesem Fall berechnet sich der K_i -Wert eines kompetitiven Inhibitors analog wie der K_m -Wert eines kompetitiven Substrates. Das preQ₁ (**3**) zeigte erwartungsgemäß den kleinsten apparenten K_i -Wert ($0,2\ \mu\text{M}$) in der Serie, da es das natürliche Substrat der *E. coli* TGT darstellt. Auch das preQ₀ (**2**), welches in tRNA von *E. coli* Q-Mutanten gefunden wurde (Noguchi et al., 1978), hat eine hohe Affinität ($K_i = 0,8\ \mu\text{M}$) als kompetitives Substrat. Die beobachtete Abnahme der Affinitäten in der Serie wurde mit dem Einfluß der Substituenten in 5-Position auf den pK_a -Wert der 7-NH-Gruppe interpretiert. In Einklang mit dem postulierten Mechanismus (Romier et al., 1996b) fördert ein elektronenziehender Substituent in 5-Position die Deprotonierung der 7-NH-Gruppe und erleichtert damit die $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion für den Basenaustausch (Hoops et al., 1995b).



2-Amino-pyrrolo[2,3-d]
pyrimidin-4(3H)-on



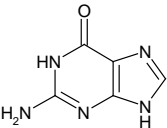
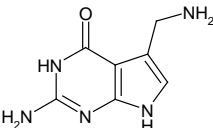
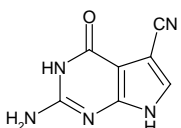
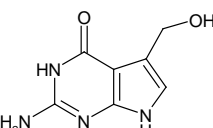
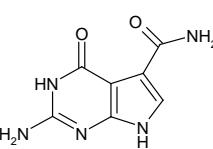
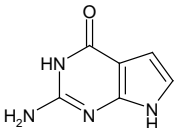
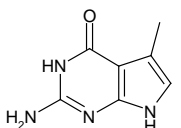
7-Methylguanin
 $K_i = 2,1\ \mu\text{M}$



FMPP
 $K_i = 114\ \mu\text{M}$

Analog zu einer früheren Studie, in der verschiedene Purin-Derivate untersucht wurden (Okada & Nishimura, 1979), zeigte 7-Methylguanin (**7**) die Eigenschaften eines kompetitiven Inhibitors ($K_i = 2,1 \mu\text{M}$). Das 5-Fluormethylen-Derivat von 2-Amino-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (FMPP, **8**) wurde als substratanaloger Inhibitor ($K_i = 114 \mu\text{M}$) entwickelt, der zu einer Inaktivierung der *E. coli* TGT führte (Hoops *et al.*, 1995a). Der Mechanismus der Inaktivierung sowie die im Protein befindliche nukleophile Gruppe, die offensichtlich unter Abspaltung eines Fluorids zur Ausbildung einer kovalenten Bindung mit FMPP führt, sind nicht bekannt.

Tab. 1: Substratspezifität der *E. coli* TGT gegenüber Deazaguanin-Derivaten. Die Verbindungen verhalten sich als kompetitive Substrate, da sie analog zum Guanin in die tRNA eingebaut werden können. Die K_i -Werte [μM] korrelieren mit dem pK_a -Wert der 7-NH-Gruppe der Deazaguanin-Derivate.

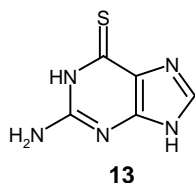
#	Verbindung	Struktur	K_i [μM]
1	Guanin		4,9
3	preQ ₁		0,2
2	preQ ₀		0,8
9	2-Amino-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3H)-on		52
10	2-Amino-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-(3H)-on-5-carboxamid		88
11	7-Deazaguanin		210
12	2-Amino-5-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on		506

3.1.2 Studien mit eukaryotischer TGT

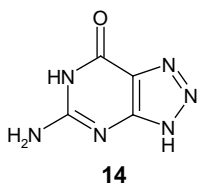
Bindungsstudien wurden ebenfalls mit eukaryotischer TGT aus verschiedenen Organismen durchgeführt. Als Substrate der TGT aus Rattenleber wurden 6-Thioguanin (**13**) und 8-Azaguanin (**14**) beschrieben (Shindo-Okada *et al.*, 1980). Pterine konnten als kompetitive Inhibitoren der TGT aus Kaninchen-Erythrozyten identifiziert werden, wobei Pterin selbst eine hohe Affinität ($K_i = 90 \text{ nM}$) *in vitro* zeigte (Jacobson *et al.*, 1981). Dagegen hatte Biopterin *in vivo* eine höhere Affinität als Pterin (**15**) und Tetrahydropterin war affiner als Biopterin gegenüber der TGT aus LM-Zellen (kultivierte Säuger-Zellen). Die unterschiedlichen Inhibitionseffekte wurden mit dem Oxidationszustand der Biopterine in Zusammenhang gebracht (Kersten *et al.*, 1983).

In einer weiteren Studie wurden Purine und Pyrimidine als Inhibitoren der TGT aus Kaninchen Retikulozyten getestet (Farkas *et al.*, 1984). Es wurde gefunden, daß die NH_2 -Gruppe in 2-Position und die Carbonylgruppe in 6-Position des 2-Aminopyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-ons (**6**) essentiell für die Interaktion der Inhibitoren sind. Darunter zeigte 8-Azaguanin (**14**) die höchste Affinität ($K_i = 23 \text{ nM}$) und konnte als kompetitives Substrat reversibel in tRNA inkorporiert werden. In der Reihe der 7-Deazapurine fiel das Antitumormittel Neplanocin A (**16**, ein 5-(Hydroxymethyl)-4-cyclopenten-1,2-diol-Derivat von Adenosin) mit einem K_i -Wert von $100 \mu\text{M}$ auf. Der K_m -Wert von Queuin (**5**) wurde mit 45 nM , der von Guanin (**1**) mit $15 \mu\text{M}$ angegeben. Dies steht in Einklang mit der biochemischen Funktion des Enzyms, Queuin gegen Guanin in der Antikodon-Schleife auszutauschen (Kirtland *et al.*, 1988).

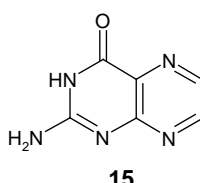
Ein *in vivo*-Assay mit kultivierten Hamster Embryo-Zellen zum Testen von Inhibitoren der eukaryotischen TGT wurde beschrieben (Muralidhar *et al.*, 1988). Dabei wird der Einbau von $[^3\text{H}]$ -Dihydroqueuine in tRNA verfolgt.



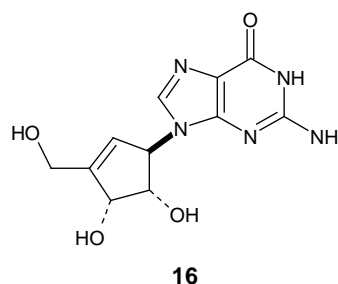
6-Thioguanin



8-Azaguanin

 $K_i = 23 \text{ nM}$ 

Pterin

 $K_i = 90 \text{ nM}$ 

Neplanocin A

 $K_i = 100 \mu\text{M}$

3.2 Strukturbasiertes Design

3.2.1 Docking-Verfahren

In den letzten Jahren wurden einige Computer-Algorithmen zum automatischen Einpassen („docking“) von Liganden in die räumlich definierte Bindungstasche eines Proteins beschrieben (Clark & Westhead, 1996). Eines der ersten Programme war DOCK, das in seiner ursprünglichen Version Liganden aus einer Datenbank entnimmt und sie mit Hilfe eines Distanzgeometrie-Verfahrens aufgrund sterischer Komplementaritäten in der Proteinbinde-tasche platziert (Kuntz *et al.*, 1982). Dazu wird die Bindetasche mit einem Satz unterschiedlich großer Kugeln gefüllt und die dadurch definierten Zentren zum Einpassen der Liganden verwendet. Dieser Ansatz wurde später durch ein Kraftfeld erweitert, das zusätzlich elektrostatische Wechselwirkungen berücksichtigt. Die neueste Version (DOCK 4.0) berücksichtigt Liganden in flexibler Form und erlaubt ein Docking multipler Konformationen (Makino & Kuntz, 1997).

Weitere Methoden zum flexiblen Einpassen von Liganden sind FLO98 (McMartin & Bohacek, 1997), AUTODOCK (Goodsell *et al.*, 1996), Hammerhead (Welch *et al.*, 1996), GOLD (Jones *et al.*, 1997) und FlexX (Rarey *et al.*, 1996). Unter diesen Programmen verfolgt FlexX eine alternative Strategie (Kapitel 4.5.2), nach der ein potentieller Ligand fragmentiert und zunächst in Form eines ausgewählten Basisfragmentes in einer günstigen Orientierung platziert wird. Der gesamte Ligand wird dann inkrementell aufgebaut, wobei nur Konformationen mit niedriger Energie und optimale Wechselwirkungen des Liganden in der Bindetasche berücksichtigt werden. Das Verfahren verläuft iterativ und kann mehrere Entscheidungsbäume beim inkrementellen Aufbau durchlaufen.

Einige der Docking-Algorithmen wurden im Rahmen des CASP2-Wettbewerbs (Second meeting on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction) zur Vorhersage der Bindungsmodi von Liganden verschiedener Proteine getestet (Dixon, 1997). Dabei konnte von einer Reihe der getesteten Programme, darunter FlexX, in über 50 % der Fälle die kristallographisch gefundene Position des Liganden mit einer räumlichen RMS-Abweichung (Kapitel 4.5.2) von $< 2 \text{ \AA}$ vorhergesagt werden.

Der Erfolg des Dockings steht in engem Zusammenhang mit der Verbesserung der Methoden, die Gibbsche Freie Energie eines computergenerierten Protein-Ligand-Komplexes und damit die Bindungsaffinität des Liganden vorherzusagen. Die Entwicklung dieser „Scoring-

Funktionen“ für die computergestützte Suche in Ligand-Datenbanken ist Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen (Kapitel 3.2.3).

3.2.2 *De novo*-Design

Das Ziel des *de novo*-Designs ist der rationale Entwurf bzw. die Modifikation von Leitstrukturen anhand der 3D-Struktur eines Proteins (Böhm, 1996). In der Literatur werden mehrere Ansätze für das computergestützte *de novo*-Design beschrieben, die im folgenden kurz vorgestellt werden (Joseph-McCarthy, 1999).

Die Programme GRID (Goodford, 1985) und MCCS (Multiple Copy Simultaneous Search) (Miranker & Karplus, 1991) beruhen auf dem Prinzip, günstige Fragment-Positionierungen vorherzusagen. Dabei werden Positionen verschiedener funktioneller Gruppen für energetisch günstige Wechselwirkungen in der Bindetasche ermittelt. Mit GRID werden Potentialwerte (z.B. elektrostatisches oder van-der-Waals-Potential) für verschiedene molekulare Sonden (z.B. Wassermolekül, aromatisches Kohlenstoffatom) berechnet und in Form konturierter Dichtediagramme dargestellt. Die Potentialfunktionen von GRID wurden an Kristallstrukturen kleiner organischer Moleküle kalibriert. GRID wurde erfolgreich bei zahlreichen Wirkstoffdesign-Projekten eingesetzt, beispielsweise bei der Modifizierung eines Inhibitors der Sialidase aus Influenza-Viren (von Itzenstein *et al.*, 1996). Programme, die nach der Fragment-Positionierung einen nachfolgenden Verknüpfungsschritt dieser Fragmente zu potentiellen Liganden ermöglichen, sind DLD (Dynamic Ligand Design) (Miranker & Karplus, 1995) und CONCERTS (Creation Of Novel Compounds by Evaluation of Residues at Target Sites) (Pearlman & Murcko, 1996). CONCERTS realisiert mehrere Verknüpfungsmöglichkeiten zuvor positionierter Fragmente in der Bindetasche mit einer Molekulardynamik-Simulation. Die Energie des potentiellen Protein-Ligand-Komplexes wird anschließend minimiert.

Liganden können auch schrittweise in der Bindetasche aufgebaut werden, z.B. mit den Programmen SmoG (Small Molecule Growth) (DeWitte & Shakhnovich, 1996), GrowMol (Bohacek & McMartin, 1994), GenStar (Rotstein & Murcko, 1993a), GroupBuild (Rotstein & Murcko, 1993b) oder GROW (Moon & Howe, 1991). Diese Methoden beginnen mit der Platzierung eines Atoms oder Fragmentes („Seed“-Atom) in einer Position der Bindetasche, die automatisch oder manuell ausgewählt werden kann. Dann werden potentielle Liganden durch sequentiellen Anbau weiterer Reste aus einer definierten Fragment-Datenbank erzeugt. Nach jedem Verknüpfungsschritt werden die entstandenen Molekülgerüste mit einer

einfachen Scoring-Funktion oder durch Kraftfeld-Rechnungen bewertet. Nachteile dieser Methoden sind, daß die erzeugten Moleküle von der Position des Seed-Atoms abhängen und häufig zu sehr komplexen Molekülen mit einer Vielzahl von Stereozentren führen. Diese sind oft nur mit einem erheblichen Aufwand synthetisierbar.

Die Kombination von Fragment-Positionierung und Datenbanksuchen wird z.B. von den Programmen HOOK (Eisen *et al.*, 1994), CAVEAT (Lauri & Bartlett, 1994) und LUDI (Böhm, 1992a) realisiert. HOOK erzeugt Molekülgerüste aus Datenbankeinträgen zunächst ohne Berücksichtigung funktioneller Gruppen. Anschließend werden optimal positionierte funktionelle Gruppen aus einer zuvor durchgeführten Suche nach der MCSS-Methode mit den Molekülgerüsten verknüpft. LUDI generiert regelbasierte Wechselwirkungszentren für Wasserstoffbrücken-Bindungen und lipophile Kontakte in der Bindetasche, die zum Docking kleiner Liganden aus einer Datenbank verwendet werden (Kapitel 4.5.1). Die Plazierungen werden mit einer einfachen Scoring-Funktion bewertet (Kapitel 3.2.3).

Die Methoden zur Fragment-Positionierung können auch zur Formulierung eines abstrakten Pharmakophors verwendet werden. Darunter versteht man eine definierte räumliche Anordnung funktioneller Gruppen, die mehreren Wirkstoffen zur spezifischen Wechselwirkung in einem aktiven Zentrum gemeinsam ist (Leach, 1996). Das Programm CATALYST ermöglicht die Definition eines Pharmakophors aus einem Satz überlagerter Liganden (Sprague, 1995). Zur Datenbanksuche mit zwei- oder dreidimensionalen Pharmakophoren können z.B. die Programme MACCS-3D (MDL, 1997) oder UNITY (UNITY, 2000) verwendet werden.

3.2.3 Scoring-Funktionen

Die nichtkovalente Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand im thermodynamischen Gleichgewicht wird mit der Gibbschen Freien Enthalpie (ΔG^0) beschrieben (Gleichung 3.2.3), die enthalpische (ΔH^0) und entropische (ΔS^0) Beiträge enthält (Böhm & Klebe, 1996):

Gleichung 3.2.3
$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT\ln K_i$$

Zur Affinität eines Liganden, die mit der Bindungskonstanten K_i angegeben wird, tragen verschiedene Faktoren bei. Dazu gehören u.a. Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische bzw. van-der-Waals-Wechselwirkungen, Solvation und hydrophobe Effekte (Ajay &

Murcko, 1995). Mit Methoden der statistischen Thermodynamik können ΔG^0 -Werte von Protein-Ligand-Komplexen approximiert werden (Kollman, 1993). Der Rechenaufwand ist jedoch viel zu hoch, um damit sinnvoll Suchen in großen Datenbanken vorzunehmen. Zur Vereinfachung kann die Freie Bindungsenthalpie ΔG^0 in additive Terme zerlegt und empirisch kalibriert werden (Dill, 1997). Dieses Konzept wurde mit der Funktion SCORE verwirklicht, in der einzelne Energiebeiträge (Kapitel 4.6.1) anhand von 45 experimentellen Protein-Ligand-Komplexen kalibriert wurden (Böhm, 1994a). Diese Funktion wurde in die Programme LUDI (Böhm, 1992b) und FlexX (Rarey et al., 1996) implementiert. Solche regressionsbasierten Scoring-Funktionen sind aufgrund ihres geringen Rechenaufwandes gut geeignet für Datenbanksuchen. Die Präzision ist jedoch bei der Vorhersage der K_i -Werte abhängig von der Qualität des zu ihrer Ableitung verwendeten Datensatzes (Böhm, 1994b). Außerdem erweisen sich die regressionsbasierten Scoring-Funktionen als unzulänglich im Hinblick auf eine Diskriminierung unterschiedlich berechneter Bindungsmodi.

Alternativ wurden wissensbasierte Ansätze verfolgt, die mit statistischen Verfahren auf die strukturelle Vielfalt in kristallographisch bestimmten Protein-Ligand-Komplexen zurückgreifen. Die Scoring-Funktion DrugScore verwendet distanzabhängige Atompaar-Präferenzen und einen Beitrag zur Beschreibung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche von Protein-Ligand-Komplexen (Gohlke *et al.*, 2000). DrugScore zeigt bei der Auswahl derjenigen Lösungen aus einer Anzahl von Docking-Studien, die dem experimentellen Bindungsmodus entsprechen, eine deutliche Verbesserung gegenüber SCORE und der in DOCK implementierten Scoring-Funktion (Gohlke et al., 2000).

3.3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist das strukturbasierte Design von Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT, wobei Methoden des *de novo*-Designs und der experimentellen Proteinbiochemie zur Anwendung kommen (Abb. 6).

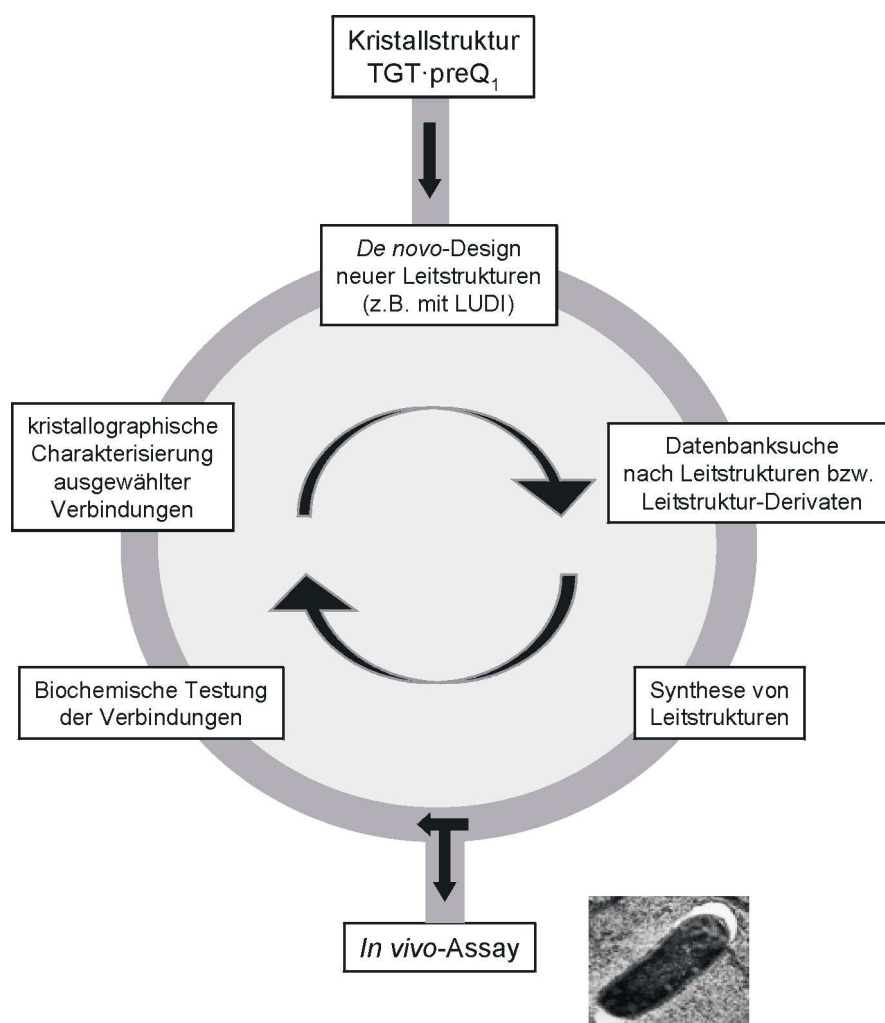


Abb. 6: Schematischer Ablauf des *de novo*-Designs von Inhibitoren der TGT in dieser Arbeit. Ausgangspunkt ist die Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit dem Substrat preQ₁. Der experimentelle Bindungsmodus liefert wichtige strukturelle Informationen zur Identifikation neuer Leitstrukturen. Zur computergestützten Suche in einer Datenbank nach ersten Vorschlägen neuer Liganden wird das *de novo*-Design Programm LUDI verwendet. Aussichtsreiche Kandidaten werden im Enzymassay charakterisiert und die Kristallstruktur in Komplex mit der TGT bestimmt. Die Verbesserung der Bindungsaffinität der Leitstruktur(en) erfolgt in einem Design-Zyklus nach folgenden Schritten: Synthese von Leitstruktur-Derivaten, biochemische und strukturelle Charakterisierung der Derivate und Modellierung neuer Vorschläge für die Synthese auf Grundlage des experimentellen Bindungsmodus. Verbindungen mit einer ausreichend hohen Bindungsaffinität können in einer späteren Projektphase auf ihre biologische Aktivität gegenüber den Shigellen in einem *in vivo*-Assay getestet werden.

Zunächst sollen einige Untersuchungen zum Verständnis des katalytischen Mechanismus der TGT erfolgen, insbesondere zur Aufklärung der Rolle von Serin-103. Durch Röntgenstrukturanalyse der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit Substrat-Analoga sollen weitere strukturelle Informationen über die Bindetasche erhalten werden. Der experimentelle Bindungsmodus von preQ₁ und Substratanaloga liefert den Ausgangspunkt zur computergestützten Suche nach neuen Leitstrukturen. Dazu wird das *de novo*-Design Programm LUDI angewendet, um in einer Datenbanksuche Moleküle mit passenden strukturellen Eigenschaften und einem günstigen Wechselwirkungsmuster in der Proteinbindetasche zu identifizieren. Vorgeschlagene Moleküle werden experimentell im Enzymassay der *Z. mobilis* TGT getestet. Die weiteren Design-Zyklen sollen in folgenden Schritten vorgenommen werden: Datenbanksuche, biochemische Testung ausgewählter Vorschläge, Strukturbestimmung, Docking modifizierter Strukturen und die Synthese neuer Vorschläge aufgrund von Docking-Ergebnissen (Abb.6).

4 Material und Methoden

4.1 Biochemische Methoden

4.1.1 Chemikalien und Kits

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Biochemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich/Fluka (Seelze), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) bezogen. Komplexmedienbestandteile und Agar stammten von Difco (Augsburg). Restriktionsendonukleasen wurden von Boehringer (Mannheim) geliefert. Säulenmaterial (Q-Sepharose, Phenyl-Sepharose) stammte von der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden). Radioaktiv markiertes $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guaninhydrogenchlorid (8,4 Ci/mmol, 0,5 mCi/ml) wurde von Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig) bezogen.

4.1.2 Medien und Puffer

4.1.2.1 Medien

Die verwendeten Medien bzw. ihre Bestandteile wurden, wenn möglich, autoklaviert (30 min, 121°C, 1,3 bar). Nicht autoklavierbare Stammlösungen wurden mit einem Filter von 0,2 µm Porengröße (Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert. Zur Herstellung von festen Nährböden wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugegeben.

LB-Medium: 1,0 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt,
0,5 % (w/v) NaCl

Die verwendeten Antibiotika-Konzentrationen für Medien und Agar waren:

Ampicillin (Amp):	100 µg/ml in aqua demin.
Chloramphenicol (Cm):	10 µg/ml in Ethanol
Kanamycin (Km):	50 µg/ml in aqua demin.

4.1.2.2 Puffer

TAE (Tris-Acetat)-Puffer:	40 mM Tris-Acetat (pH 8,0), 4 mM EDTA
TBE (Tris-Borat)-Puffer:	45 mM Tris (pH 8,0), 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA
TE (Tris-EDTA)-Puffer:	10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA

4.1.3 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 2, die verwendeten Plasmide in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Beschreibung	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> XL2-blue	(<i>mcrA</i>)183 (<i>mcrB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB laqI</i> ^o ZΔM15 Tn5(Km ^r)]	Stratagene (Heidelberg)
BL21(DE3) pLysS	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal λ</i> (DE3) [pLysS Km ^r]	Stratagene (Heidelberg)

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pET9d-ZM4	Cm ^r , Km ^r ; ColEI-origin, <i>tac</i> -Promotor, kodiert für <i>lacI</i> ^q <i>malE</i> <i>lacZα</i> ; enthält <i>tgt</i> als 1,3 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Nco</i> I-Fragment in pET9d	(Reuter & Ficner, 1995)
pET9d-ZM4-S103A	Cm ^r , Km ^r ; Ser-103-Ala Mutante der TGT	diese Arbeit
pET9d-ZM4-Y106W	Cm ^r , Km ^r ; Tyr-106-Trp Mutante der TGT	diese Arbeit

Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen von *E. coli*-Stämmen angelegt und bei -70°C gelagert.

4.1.4 DNA-Präparation und Klonierungstechniken

Lösungen, Reaktionsgefäße und Gebrauchsmaterial für den Umgang mit Nukleinsäuren wurden, soweit möglich, autoklaviert (30 min bei 121°C und 1,3 bar), um eventuell vorhandene Nukleasen zu inaktivieren. Glaspipetten wurden durch trockene Hitze (4 h, 180°C) sterilisiert.

4.1.4.1 Plasmid Midi-Präparation mit Nucleobond AX 100-Kit

Bei der Plasmid Midi-Präparation werden die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen (Birnboim & Doly, 1979), wobei die DNA denaturiert wird. Eine anschließende Neutralisation ermöglicht eine isolierte Renaturierung der Plasmid-DNA, während chromosomale DNA mit Proteinen ausfällt. Die Plasmid-DNA wird spezifisch und reversibel an Ionenaustausch-Säulen gebunden, so daß sie durch Waschen gereinigt und mit hoher Salzkonzentration gezielt eluiert werden kann.

Die Präparation erfolgte mit dem Nucleobond AX 100-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben in folgenden Schritten: 100 ml einer hochgewachsenen Kultur wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 x g). Die Zellen wurden in 4 ml S1-Puffer (s.u.) resuspendiert und durch Zugabe von 4 ml S2-Puffer und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur aufgeschlossen. Anschließend wurden zur Neutralisation 4 ml eiskalter S3-Puffer zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Ausgefallene Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer wurden durch zweimalige Zentrifugation (30 min, 13000 x g, 4°C) sedimentiert. Der DNA-haltige Überstand wurde auf die mit 2 ml N2-Puffer äquilibrierte Säule (Nucleobond AX 100) gegeben. Danach wurde die Säule zweimal mit 4 ml N3-Puffer gewaschen und die DNA mit hoher Salzkonzentration (5 ml N5-Puffer) eluiert.

Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Das Gemisch wurde anschließend 10 min bei 13000 x g zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in TE-Puffer oder aqua demin. aufgenommen.

S1-Puffer:	50 mM Tris (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
S2-Puffer:	200 mM NaOH, 1 % SDS
S3-Puffer:	2,8 M Kaliumacetat (pH 5,2)
N2-Puffer:	100 mM Tris (pH 6,3), 900 mM KCl, 15 % (v/v) Ethanol

N3-Puffer: 100 mM Tris (pH 6,3), 1,15 M Kaliumacetat, 15 % (v/v) Ethanol

N5-Puffer: 100 mM Tris (pH 8,5), 1 M Kaliumacetat, 15 % (v/v) Ethanol

4.1.4.2 Bestimmung des DNA-Gehalts

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure-Lösungen erfolgte photometrisch in wässriger Lösung. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm und das von Proteinen bei 280 nm. Die DNA-Konzentration wurde nach der empirischen Formel für doppelsträngige DNA berechnet: $\mu\text{g DNA/ml} = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ (Sambrook *et al.*, 1989). Die Reinheit wurde anhand des Quotienten A_{260}/A_{280} abgeschätzt: bei einem Wert von 1,8 - 2,0 beträgt die Reinheit der DNA 70 - 95 %.

4.1.4.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Für analytische und präparative Zwecke wurde DNA mit TypII-Restriktionsendonucleasen behandelt, die in der Regel palindromische Sequenzen erkennen. Durch die Spaltung der Erkennungssequenz (4-8 Nukleotide) entstehen glatte oder einzelsträngige 3'- bzw. 5'-überhängende Enden.

Die in TE-Puffer bzw. Wasser gelöste DNA wurde mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease und dem dazugehörigen Reaktionspuffer versetzt und 2 bis 12 h bei 37°C inkubiert. Die Berechnung der notwendigen Enzymmengen erfolgte nach der Formel 1 u/ μg DNA/h. Die Reaktion wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese (Kapitel 4.1.4.4) überprüft.

4.1.4.4 Agarosegelelektrophorese

Die Restriktions-Fragmente wurden in 0,7 - 1,0 %igen horizontalen Agarosegelen in TAE-Puffer bei konstanter Spannung (100 V) elektrophoretisch voneinander getrennt (Sambrook *et al.*, 1989). Als Vergleichsstandard wurde die mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* behandelte DNA des Bakteriophagen Lambda benutzt (GibcoBRL, Eggenstein). DNA-Vergleichsstandard und DNA-Proben wurden gleichzeitig im Agarosegel aufgetrennt und die Fragmentgrößen der Proben im Vergleich zu den bekannten Größen der Fragmente der gespaltenen Lambda-DNA bestimmt.

Die DNA-Proben wurden mit ¼ Volumen Ladungspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 40 % Saccharose) versetzt und in die geformten Agarosetaschen gegeben. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch Einlagerung von Ethidiumbromid (10 mg/ml)

unter UV-Licht (254 nm) auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht. Analytische Gele wurden fotografiert (3¼ inch x 4¼ inch, Polaroid 667), bei präparativen Gelen wurde die interessierende Bande ausgeschnitten.

4.1.4.5 Isolierung von DNA-Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem QIAEX II-System (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der selektiven und quantitativen Adsorption von DNA an Silica-Gel Partikel unter Hochsalz-Bedingungen, woran sie während des Waschens gebunden bleibt und am Ende spezifisch abgelöst werden kann.

Das interessierende Agarosegelstück wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und je 250 mg Agarosegel mit 750 µl QX1-Puffer versetzt. Nach Zugabe von 30 µl QIAEX II-Suspension wurde der Ansatz 10 min bei 50°C inkubiert, wobei die Lösung alle 2 min kurz geschüttelt wurde, um die Silica-Gel Partikel in Suspension zu halten. Die hohe Konzentration an chaotrophen Salz in dem QX1-Puffer schwächt die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Zuckern im Agarosepolymer und erlaubt somit ein Auflösen des Gels. Die Silica-Gel Partikel wurden durch Zentrifugation (1 min bei 8000 x g) und Resuspendierung einmal in je 500 µl QX1-Puffer und zweimal in QE-Puffer gewaschen. Nachdem das Pellet für 10 min an der Luft getrocknet wurde, eluierte man die DNA durch Lösen des Pellets in 30 µl TE-Puffer und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugation (1 min, 13000 x g) wurden die unlöslichen Silica-Gel Partikel entfernt.

4.1.4.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen (polymerase chain reaction, PCR, Kapitel 4.1.5.8) wurde das High-Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim) verwendet. Die Reinigung erfolgt bei dieser Methode durch spezifische Bindung der DNA an Glasfaser-Oberflächen in Gegenwart eines chaotropen Salzes (Vogelstein & Gillespie, 1979). In einem Waschschrift werden Verunreinigungen (freie Nucleotide, nicht gebundene Primer, Salze, Mineralöl sowie die DNA-Polymerase) entfernt und die amplifizierte DNA mit einem Niedrigsalzpuffer eluiert. Die Aufreinigung eines 100 µl PCR-Ansatzes erfolgte nach dem Standard-Protokoll des Herstellers.

4.1.4.7 DNA-Ligation

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der ATP-abhängigen T4-DNA-Ligase (New England Biolab). Die Reaktion wurde mit 1 u Enzym in einem Volumen von 40 µl des Ligationspuffers (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA) durchgeführt. Es wurden etwa 1 µg des Klonierungsvektors und eine äquimolare Menge des zu klonierenden Inserts eingesetzt und der Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 1 bis 5 µl des Ligationsansatzes zur Transformation in kompetente Zellen eingesetzt.

4.1.4.8 Transformation

Zur Transformation wurde die DNA zunächst 60 min bei 0°C mit 200 µl Calcium-kompetenten Zellen (*E. coli* BL21 (DE3), Stratagene) inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 3 min bei 42°C und 2 min Abschrecken auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei RT belassen, bevor 1 ml LB-Medium zugegeben und 45 min bei 37°C inkubiert wurde. Schließlich wurde der Transformationsansatz auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.1.4.9 Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR

Die gezielte Einführung von Mutationen in DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR, (Saiki *et al.*, 1988)) nach einem modifizierten Protokoll (Grädler *et al.*, 1999). Dabei wird die zu mutierende DNA in wiederholten Zyklen zunächst durch Hitzedenaturierung in Einzelstrang-DNA (ss-DNA) überführt. An dieser ss-DNA wird durch komplementäre Anlagerung des synthetischen Mutantenprimers (MWG-Biotech, Ebersberg) die DNA-Replikation mittels der hitzestabilen *PwoI* DNA-Polymerase initiiert. Der neu synthetisierte DNA-Strang kodiert nun für das mutierte Gen.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl angesetzt, bestehend aus: 50 - 100 ng DNA-Template, 200 µM dNTPs, 200 pmol der reverse- und forward-primer (Tab. 4), 2 mM MgCl₂ und 2 u *PwoI* DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) in 1 x fach *PwoI* DNA-Polymerase-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,85, 250 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgCl₂).

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll: 5 min 93°C, 20 Zyklen (50 sek 93°C, 30 sek 52°C, 1 min 72°C), 5 min 72°C. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurde mit dem High-Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim) gereinigt (Kapitel 4.1.5.6).

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer zur ortsspezifischen Mutagenese.

Bezeichnung	Sequenz
T7-s	5' > AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG < 3'
T7-a	5' > CTA GTT ATT GCT CAG CGG TG < 3'
S103A-s	5' > CT ATT TTG ACG GAT <u>GCC</u> GGC GGG TAT CAG < 3'
S103A-a	5' > C CTG ATA CCC GCC <u>GGC</u> ATC CGT CAA AAA G < 3'
Y106W-s	5' > G ACG GAT AGC GGC GGG <u>TGG</u> CAG GTG ATC CTA TC < 3'
Y106W-a	5' > GA TAG GCT CAT CAC CTG <u>CCA</u> CCC GCC GCT ATC CGT C < 3'

4.1.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalysen wurden nach der Didesoxymethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Hierzu wurde das „Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“-Kit der Firma Applied Biosystems (Division of Perkin Elmer, USA) eingesetzt.

Als Templat-DNA diente gereinigte DNA (Nucleobond AX 100, 4.1.4.1), von der 500 ng zusammen mit 3 µl Terminator Ready Reaction Mix und 10 pmol Primer (Tab. 5) in 10 µl angesetzt wurde. Der Terminator Ready Reaction Mix enthält die AmpliTaq DNA-Polymerase sowie 2',3'-Didesoxyribonucleosidtriphosphate mit einer Fluoreszenz-sensitiven Gruppe. Der Reaktion erfolgte auf einem Thermocycler mittels PCR nach folgendem Protokoll: 25 Zyklen (10 sec 96°C, 5 sec 50°C und 4 min 60°C). Die Reaktionsansätze wurden mit 90 µl aqua demin. versetzt und die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Das Gemisch wurde anschließend 30 min bei 13000 x g zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, 20 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 25 µl TSR-Puffer (Template Suppression Reagent) aufgenommen.

Die elektrophoretische Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit dem automatischen Sequenzer ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems, Perkin Elmer, USA).

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete DNA-Primer zur Sequenzanalyse.

Bezeichnung	Sequenz
S-204	5' > GCA ACT GGC GCT GAT ATT ATC TTG < 3'
T7-s	5' > AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG < 3'
Y106W-s	5' > G ACG GAT AGC GGC GGG <u>TGG</u> CAG GTG ATC CTA TC < 3'
S-650	5' > TCT GCG GCA ACA ATC GGC GGA TGC < 3'
S-843	5' > CGC GGC ATT GAT ATG GGC GGA TGC < 3'
A-180	5' > AAG ATA ATA TCA GCG CCA GTT GCC < 3'

4.1.6 tRNA^{Tyr}-Präparation

4.1.6.1 *In vitro*-Transkription von tRNA^{Tyr}

Die Präparation von nicht-modifizierter *E. coli* tRNA^{Tyr} (ECY2) erfolgte durch *in vitro*-Transkription (Curnow et al., 1993). Die Templat-DNA wurde zunächst durch Restriktionsspaltung des Plasmids ptRNA2 erhalten: 200 µg ptRNA2 wurden mit 50 U *Bst*NI (New England Biolab) in einem 565 µl Ansatz (10 mM Tris/HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT) 8 h bei 60°C inkubiert. Die DNA wurde mit je 1 Volumen Phenol und Chloroform/Amylalkohol (24:1) extrahiert und durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 1,0 Volumen Ethanol 12 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (12000 x g, 30 min) wurde die DNA in aqua demin. resuspendiert.

Mit dem erhaltenen Templat (ptRNA2/*Bst*NI) erfolgte anschließend die *in vitro*-Transkription: 50 µg ptRNA/*Bst*NI wurden mit 250 nM T7 RNA Polymerase (Grodberg & Dunn, 1988) in 4 ml Reaktionspuffer 5 h bei 37°C inkubiert. Die tRNA wurde mit je 1 Volumen Phenol und Chloroform/Amylalkohol (24:1) extrahiert und durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 1,0 Volumen Ethanol 12 h bei -20°C gefällt. Das bei der anschließenden Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in FPLC-Puffer resuspendiert.

Reaktionspuffer: 40 mM Tris/HCl (pH 8,0), 20 mM MgCl₂, 1 mM Spermidin, 5 mM DTT, 5 µg/ml BSA, je 4 mM ATP, CTP, GTP und UTP, 1 U/ml anorgan. Phosphatase (Boehringer Mannheim), 25 U/ml RNase Inhibitor (Boehringer Mannheim)

FPLC-Puffer: 10 mM HEPES (pH 7,3), 7 M Harnstoff, 1 mM EDTA

4.1.6.2 Reinigung von tRNA^{Tyr}

Die *in vitro*-transkribierte tRNA^{Tyr} (Kapitel 4.1.6.1) wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie (MonoQ HR 10/10, 1 x 10 cm, Pharmacia) gereinigt. Dazu wurde das in FPLC-Puffer (Kapitel 4.1.6.1) gelöste tRNA-Pellet auf die MonoQ-Säule aufgetragen, welche zuvor mit FPLC-Puffer äquilibriert worden war. Die Elution der tRNA^{Tyr} erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M bei etwa 650 mM NaCl.

Zur Entsalzung der vereinigten tRNA^{Tyr}-haltigen Fraktionen wurden diese mit 2 Volumen 10 M HEPES (pH 7,3) verdünnt und die tRNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 2,5 Volumen Ethanol 12 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (12000 x g, 1 h) wurde die tRNA in 20 - 30 ml 10 M HEPES (pH 5,3) resuspendiert und die Ethanol-Fällung wiederholt.

Die Monomerisierung der tRNA erfolgte in 10 mM HEPES (pH 5,3) und 1 mM MgCl₂ durch langsames Erhitzen innerhalb von 45 min auf 70°C (im Wasserbad) und weiterer Inkubation für 30 min bei 70°C. Danach wurde die Lösung 1,5 h auf Eis gekühlt, anschließend die tRNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 2,5 Volumen Ethanol 12 h bei -20°C gefällt und in einem kleinen Volumen Puffer (10 mM HEPES, pH 7,3, 1 mM MgCl₂) resuspendiert.

4.1.6.3 Bestimmung des tRNA^{Tyr}-Gehalts

Die Konzentrationsbestimmung der tRNA^{Tyr} erfolgte photometrisch mit folgender Formel: $1 \mu\text{M tRNA}^{\text{Tyr}} \equiv 0,703 A_{260}$ (Curnow et al., 1993). Die Reinheit wurde durch native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 4.1.7.5) und anhand des Quotienten A_{260}/A_{280} abgeschätzt: bei einem Wert von 1,8 - 2,0 beträgt die Reinheit der tRNA^{Tyr} > 90 % (Sambrook et al., 1989).

4.1.7 Proteinchemische Methoden

4.1.7.1 Zellanzucht und Überexpression der *Z. mobilis* TGT in *E. coli*

Zunächst wurde eine Vorkultur der *E. coli* BL21(DE3)/pLysS-Stämme mit den entsprechenden Überexpressionsplasmiden (Tab. 2) in 100 ml LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika bei 37°C angezogen. Die Vorkultur wurde 1:100 im gleichen Medium (1000 ml)

verdünnt und die Hauptkultur bei 14°C und 250 Upm bis $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ wachsen gelassen. Diesen exponentiell-wachsenden Kulturen wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1,0 mM zugegeben und für weitere 24 h bei 14°C und 250 Upm inkubiert. Die Zellen wurden danach durch Zentrifugation (10 min bei 5000 x g, 4°C) geerntet und bei -20°C aufbewahrt. Zur Überprüfung der Überexpression (durch SDS-PAGE, Kapitel 4.1.7.5) wurden 1 ml-Aliquots der Kulturen vor und nach der IPTG-Zugabe entnommen und die Zellen durch Zentrifugation (1 min bei 13000 x g, 4°C) geerntet.

4.1.7.2 Herstellung eines S100-Protein-Rohextraktes

Nach der Überexpression wurden die Zellpellets (Kapitel 4.1.7.1) in 50 ml Protein-Extraktions-Puffer resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier 250, dreimal 2 min, duty cycle 70 %, output control 5) auf Eis aufgeschlossen. Nach Zentrifugation erst bei 16000 u/min (45 min, SS34-Rotor, 4°C) und anschließend bei 36000 u/min (90 min, Ti70-Rotor, 4°C) wurden die Pellets jeweils verworfen und der Überstand der letzten Zentrifugation (S100) bei -70°C schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

Protein-Extraktions-Puffer: 20 mM Tris (pH 7,8), 10 mM EDTA, 1 mM DTT,
0,2 % (v/v) Nonidet P-40, 1 Tablette/50 ml Complete™
(Protease-Inhibitor-Cocktail, Boehringer)

4.1.7.3 Aufreinigung der TGT mittels Säulenchromatographie

Die Reinigung der *Z. mobilis* TGT erfolgte in zwei säulenchromatographischen Schritten (Q-Sepharose und Phenyl-Sepharose) sowie einer präparativen Kristallisation durch Dialyse (Reuter & Ficner, 1995). Für die Säulenchromatographie wurde eine FPLC-Anlage (ÄKTA Explorer, Pharmacia) verwendet.

Der Proteinrohextrakt der S-100 Zentrifugation (Kapitel 4.1.7.2) wurde im ersten Schritt auf eine Anionenaustauscher-Säule (Q-Sepharose, XK26, 2,6 x 20 cm, Pharmacia) aufgetragen, die zuvor mit 2 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert wurde. Nach Waschen mit einem Säulenvolumen Puffer A erfolgte die Elution der TGT mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M (Puffer B) bei etwa 300 mM NaCl (Flußrate 4 ml/min). Die TGT-haltigen Fraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Kapitel 4.1.7.5) identifiziert, vereinigt und mit Ammoniumsulfat bis zu einer

Endkonzentration von 1 M versetzt. Diese Lösung wurde für den zweiten chromatographischen Trennschritt mit einer hydrophoben Säule (Phenyl-Sepharose, XK 16, 1,6 x 10 cm, Pharmacia) verwendet. Dazu wurde die Phenyl-Sepharose zunächst mit 2 Säulenvolumen Puffer C äquilibriert und nach Auftragen der Probe mit 1 Säulenvolumen Puffer C gewaschen. Die Elution der TGT erfolgte mit einem linearen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten von 1 bis 0 M (Puffer A) bei etwa 500 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Flußrate 2 ml/min). Nach einer SDS-PAGE wurden die TGT-haltigen Fraktionen vereinigt und auf eine Proteinkonzentration von etwa 3 mg/ml (Kapitel 4.1.7.4) ankonzentriert (Centriprep 30k, Amicon). Der letzte Reinigungsschritt erfolgte durch präparative Kristallisation nach Dialyse. Dazu wurde die ankonzentrierte Proteinlösung in 15-ml Dialyse-Kassetten (Slide-A-LyzerTM, Pierce, Niederlande) gefüllt und bei 4°C über Nacht gegen 5 l Puffer A dialysiert.

Die nach der Dialyse ausgefallenen Mikrokristalle wurden abzentrifugiert (20 min bei 3000 x g, 4°C) und durch Lösen in Hochsalz-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 M NaCl, 0,01 % (w/v) Natriumazid) auf die gewünschte Konzentration (Kapitel 4.1.7.4) gebracht. Für Kristallisations-Experimente (Kapitel 4.2.1) wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration von 12 - 15 mg/ml angesetzt, für den Enzymassay (Kapitel 4.1.7.7) 1 - 5 mg/ml. Die Lösungen wurden portioniert (je 50 µl für Kristallisations-Experimente, je 10 µl für den Enzymassay) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt. Die Ausbeuten bei der Proteinreinigung betrugen 5 - 10 mg *Z. mobilis* TGT (Wildtyp bzw. Mutante) aus 1 l *E. coli*-Kultur.

Puffer A: 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT,
0,01 % (w/v) Natriumazid

Puffer B: Puffer A + 1 M NaCl

Puffer C: Puffer A + 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

4.1.7.4 Quantitative Proteinbestimmung

Die Gehaltsbestimmung der *Z. mobilis* TGT erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 280 nm. Dabei wurde der Absorptionskoeffizient aus der Aminosäure-Sequenz der *Z. mobilis* TGT (Wildtyp bzw. Mutante) berechnet (Cantor & Schimmel, 1980):

$$1 \text{ mg/ml (23,4 } \mu\text{M) } Z. mobilis \text{ TGT (w.t. bzw. S103A)} \equiv 0,778 A_{280}$$

$$1 \text{ mg/ml (23,4 } \mu\text{M) } Z. mobilis \text{ TGT (Y106W)} \equiv 0,864 A_{280}$$

4.1.7.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden mit Hilfe der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die dafür notwendigen Lösungen und Gele wurden nach Standardmethoden hergestellt (Sambrook et al., 1989). Vor dem Auftragen des Proteinextraktes auf ein Gel wurde die Probe mit 1 Volumen Protein-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Als Molekulargewichtsstandard diente ein definiertes Gemisch kleinerer Proteine mit einem M_r von 19,4 bis 105 kDa (Biorad, München). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke von 20 mA im Sammelgel bzw. 24 mA im Trenngel. Zur Identifizierung wurden die Gele 45 min mit Färbelösung behandelt und mit Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Für Gelshift-Studien (Kapitel 4.1.7.8) wurden modifizierte Bedingungen angewendet und die Protein- und tRNA-Banden mit einer Silberfärbung (Kapitel 4.1.7.6) sichtbar gemacht.

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zur Auftrennung von tRNA (Kapitel 4.1.6.3) wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

Protein-Ladepuffer:	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) Mercaptoethanol, 20 µg/ml Bromphenolblau
Laufpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS (pH 8,3)
Färbelösung:	40 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,2 % (w/v) Coomassie TM Brilliant Blue G250
Entfärbelösung:	30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

4.1.7.6 Silberfärbung von Proteingelen

Zur Identifizierung schwacher Banden (z.B. bei Gelshift-Studien, Kapitel 4.1.7.7) wurden die Proteingele einer Silberfärbung unterzogen (Blum *et al.*, 1987). Dazu wurde das Polyacrylamidgel mindestens 1 h in 50 % (v/v) Methanol und 12 % (v/v) Essigsäure fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 50 % (v/v) bzw. 30 % (v/v) Ethanol für 20 min wurde das Gel genau 60 sec mit einer 0,8 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung behandelt. Das überschüssige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit aqua demin. für je 20 sec entfernt und das Gel in 0,2 % (w/v) AgNO_3 und 0,026 % (v/v) Formaldehyd in aqua demin. gelegt. Danach wurde dreimal mit aqua demin. gewaschen und in 0,6 % (w/v) Na_2CO_3 , 0,0185 % (v/v) Formaldehyd

und 16 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ entwickelt. Nach Erscheinen der gewünschten Banden wurde der Entwicklungsprozeß mit 50 % (v/v) Methanol und 12 % (v/v) Essigsäure gestoppt und das Gel noch zweimal mit aqua demin. gewaschen.

4.1.7.7 Gelshift-Studien

Die gereinigte tRNA^{Tyr} (Kapitel 4.1.6) wurde in 5 mM Natriumkacodylat (pH 6,5), 2 mM MgCl_2 und 0,2 mM EDTA gelöst, die mikrokristalline Form der TGT (Wildtyp bzw. Mutante, Kapitel 4.1.7.3) wurde in 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 400 mM NaCl und 1 mM EDTA resuspendiert.

Die Bindungsreaktion erfolgte 1 h bei 37°C in 15 μl -Ansätzen: 3 μM TGT (Wildtyp bzw. Mutante), 60 μM tRNA^{Tyr} in 10 mM HEPES (pH 7,5), 10 mM MgCl_2 und 1 mM EDTA. Als Kontrollen wurde TGT (Wildtyp bzw. Mutante) und tRNA^{Tyr} jeweils separat unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Proben sofort mit 7 μl Auftragspuffer (60 mM Tris, pH 6,8, 10 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS und 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und auf ein natives 12,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte etwa 170 min bei 100 V in 25 mM Tris (pH 8,8), 200 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS. Anschließend wurden die Protein- und tRNA-Banden durch Silberfärbung (Kapitel 4.1.7.6) sichtbar gemacht.

4.1.8 Enzymassay der *Z. mobilis* TGT

4.1.8.1 Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{\max}

Der Enzymassay der TGT beruht auf der Eigenschaft des Enzyms, das G34 in der Antikodon-Schleife der tRNA gegen freies Guanin im Reaktionsansatz auszutauschen. Als freies Guanin wird $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$ eingesetzt, was zu einer radioaktiven Markierung der tRNA führt (Curnow et al., 1993). Die kinetischen Parameter (K_m und k_{cat}) der *Z. mobilis* TGT (Wildtyp bzw. S103A) wurden aus der Einbaurate von $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$ in unmodifizierte tRNA^{Tyr} (Kapitel 4.1.6) ermittelt. Dazu wurden verschiedene $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$ -Konzentrationen (0,2 - 20 μM ; 8,4 mCi/mmol) bei 37°C in einem 100 μl -Ansatz bestehend aus 100 mM HEPES (pH 7,3), 20 mM MgCl_2 und 20 μM tRNA^{Tyr} inkubiert und die Enzymreaktion durch Zugabe von 75 nM *Z. mobilis* TGT gestartet. Dem Reaktionsansatz wurde in 1 min-Intervallen innerhalb von 5 min nach Zugabe des Enzyms 15 μl -Aliquots entnommen

und auf GF/C-Filterplättchen (Whatman) pipettiert. Zur vollständigen Fällung der tRNA wurden die Filterplättchen sofort in eiskalte 10 %ige (w/v) Trichloressigsäurelösung (TCA) gebracht und darin für weitere 30 min inkubiert. Nach jeweils zweimaligem Waschen für 10 min mit 5 %iger (w/v) TCA und Ethanol wurden die Filterplättchen wenige Minuten bei 60°C getrocknet und die experimentelle Zählrate der Radioaktivität (cpm, counts per minute) durch Flüssigscintillations-Zählung in 4 ml Toluolscintillator (Roth, Karlsruhe) bestimmt. Zur Berechnung des eingebauten [8-³H]-Guanins in die tRNA wurde der gemessene cpm-Wert nach folgender Beziehung (Gleichung 4.1.8.1-1) in die Stoffmenge n_{Guanin} [mol] umgerechnet:

Gleichung 4.1.8.1-1:

$$n_{\text{Guanin}}[\text{mol}] = \frac{x[\text{cpm}] \cdot \phi[\text{dpm} / \text{cpm}]}{2,22 \cdot 10^{12} [\text{dpm/Ci}] \cdot a[\text{Ci/mol}]}$$

Darin sind: x, experimentelle Zählrate der Radioaktivität [cpm]; a, spezifische Aktivität des [8-³H]-Guanins [Ci/mol]; Φ , Detektorsensitivität [dpm/cpm]. In dieser Arbeit wurde ein Wert von 0,00246 für Φ verwendet. Zudem wurde der Umrechnungsfaktor von Curie (Ci) in die theoretische Zählrate der Radioaktivität (dpm, detections per minute) benutzt (1 Ci = $2,22 \cdot 10^{12}$ dpm).

Die Anfangsgeschwindigkeit v_0 wurde aus der Steigung der Regressionsgeraden einer Auftragung von n_{Guanin} [pmol] gegen die Reaktionszeit t [min] ermittelt. Aus der Auftragung von v_0 [pmol/min] gegen die [8-³H]-Guanin-Konzentration S [μM] und nichtlinearer Kurvenanpassung an die Henri-Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 4.1.8.1-2) mit dem Programm Origin (Version 5.0, Microcal Software Inc., USA) wurden die kinetischen Parameter (K_m und v_{max}) bestimmt:

Gleichung 4.1.8.1-2

$$v_0 = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Darin sind (Cleland, 1963): [S], [8-³H]-Guanin-Konzentration; v_0 , Anfangsgeschwindigkeit bei gegebenen [S]; v_{max} , maximale Geschwindigkeit der Enzymreaktion; K_m , Michaelis-Konstante.

Die apparente Michaelis-Konstante (K_m) ist die Substrat-Konzentration, bei der die Hälfte der maximalen Geschwindigkeit ($v_{\text{max}}/2$) unter sättigender Substrat-Konzentration erreicht wird. Der K_m -Wert hängt ab von der Art des Enzyms und des Substrates, sowie von der Temperatur und vom pH-Wert. Wenn die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes sehr viel schneller verläuft als die Produktbildung, ist K_m ein Maß für die Affinität des Enzyms für das Substrat.

Zur Beurteilung der katalytischen Effizienz eines Enzyms wird häufig das Verhältnis k_{cat}/K_m angegeben (Gleichung 4.1.8.1-3):

Gleichung 4.1.8.1-3

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{v_{max}}{[E]_t \cdot K_m}$$

Darin sind (Cleland, 1963): v_{max} , maximale Geschwindigkeit der Enzymreaktion; $[E]_t$, Enzymkonzentration im Ansatz; K_m , Michaelis-Konstante.

4.1.8.2 Bestimmung von K_i -Werten

Zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten (K_i -Werte) von Inhibitoren wurde auf beschriebene Methoden (Hoops et al., 1995b) für die *E. coli* TGT zurückgegriffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bedingungen für den Enzymassay der *Z. mobilis* TGT durch einen zusätzlichen Präinkubationsschritt modifiziert. Dabei wird die TGT zunächst für eine bestimmte Zeit (20 min) mit dem Inhibitor inkubiert, bevor die Enzymreaktion durch Zugabe von Substrat (tRNA und $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$) initiiert wird. Aufgrund ihrer geringen Löslichkeit in dem verwendeten Puffer wurden die Inhibitoren in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Eine DMSO-Konzentration von maximal 10 % (v/v) im Reaktionsansatz zeigte keinen signifikanten Einfluß auf die Enzymaktivität.

Im ersten Schritt wurde ein 38 μl -Ansatz mit 150 nM *Z. mobilis* TGT mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors in 100 mM HEPES (pH 7.3), 20 mM MgCl_2 und 10 % (v/v) DMSO 20 min bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde im zweiten Schritt durch Zugabe des gleichen Volumens (38 μl) einer auf 37°C vorgewärmten Mischung aus 2 μM $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$ und 16 μM tRNA^{Tyr} in 100 mM HEPES (pH 7,3) und 20 mM MgCl_2 ausgelöst. Dem Reaktionsansatz wurde in 1 min-Zeitabständen 15 μl -Aliquots entnommen und analog zu dem oben beschriebenen Verfahren (Kapitel 4.1.8.1) die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion bestimmt.

Die Bestimmung der Inhibitionskonstante (K_i -Wert) eines kompetitiven Inhibitors erfolgte nach der Methode von Dixon (Dixon & Webb, 1979). Dazu wurde mit den Gleichungen 4.1.8.1-3 und 4.1.8.2-1 das Verhältnis v_0/v_i durch eine modifizierte Gleichung ausgedrückt (Gleichung 4.1.8.2-3):

Gleichung 4.1.8.2-1

$$v_i = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \vee \quad v_i = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

Gleichung 4.1.8.2-3

$$\Rightarrow \frac{v_0}{v_i} \cdot \frac{K_m + [S]}{K_m} = \frac{1}{K_i} \cdot [I] + \left(\frac{[S]}{K_m} + 1 \right)$$

Darin sind (Cleland, 1963): [S], [8-³H]-Guanin-Konzentration; [I], Inhibitor-Konzentration; v_0 , Anfangsgeschwindigkeit bei [S] in Abwesenheit des Inhibitors; v_i , Anfangsgeschwindigkeit bei [S] in Anwesenheit des Inhibitors; K_m , apparente Michaelis-Konstante; K_i , apparente Inhibitionskonstante.

Aus der Auftragung von $v_0((K_m + [S])/K_m)/v_i$ gegen die Inhibitor-Konzentration I [μ M] nach Gleichung 4.1.8.2-1 und linearer Regression mit dem Programm Origin (Version 5.0, Microcal Software Inc., USA) wurde die apparente Inhibitionskonstante (K_i) bestimmt.

4.2 Proteinstrukturaufklärung

Die Röntgenstrukturanalyse ist eine seit langer Zeit etablierte Methode zur Aufklärung von Proteinstrukturen. Dabei ist die erfolgreiche Kristallisation des Proteins eine notwendige Voraussetzung für die Strukturbestimmung mittels Röntgenbeugung. Kleinere Proteine können mit Hilfe der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Die Kryo-Elektronenmikroskopie ist eine relativ junge Methode zur Strukturbestimmung von membrangebundenen Rezeptorproteinen. Die 3D-Strukturen von Proteinen werden in der *Protein Data Bank* (PDB)¹ (Bernstein *et al.*, 1977) gesammelt.

4.2.1 Kristallisation der *Z. mobilis* TGT

Zur Röntgenstrukturanalyse benötigt man Einkristalle des Proteins und daher zunächst Bedingungen, die eine Kristallisation des Proteins ermöglichen. Die Löslichkeit eines Proteins wird gezielt beeinflusst, indem durch langsame Änderung der äußeren Bedingungen eine Übersättigung der Lösung erreicht wird, in der sich Kristallisationskeime und daraus schließlich größere Kristalle bilden.

Die bei der Aufreinigung erhaltenen Mikrokristalle der *Z. mobilis* TGT (Kapitel 4.1.7.3) sind für eine Röntgenstrukturanalyse zu klein (Romier *et al.*, 1996a). Die Mikrokristalle wurden daher zur Kristallisation zunächst wieder in einem Hochsalzpuffer, der 2 M NaCl enthält, gelöst (Kapitel 4.1.7.3). Dieser „Einsalzeffekt“ ist auf die Oberflächenladungen der Proteine zurückzuführen, welche aus der Anwesenheit geladener Aminosäure-Seitenketten resultiert. Bei steigender Ionenstärke (Erhöhung der NaCl-Konzentration) stehen zunehmend Gegenionen zur Abschirmung der Ionenladungen in den Proteinen zur Verfügung, wodurch sich die Löslichkeit des Proteins erhöht. Bei bestimmten Ionenstärken wird dagegen ein „Aussalzen“ des Proteins erreicht, da durch die Solvation des Salzes Wassermoleküle aus der Hydrathülle des Proteins entzogen werden.

Durch Hinzufügen eines sogenannten Präzipitans kann die Übersättigung einer Proteinlösung gefördert werden. Als Präzipitans werden anorganische Salze, Polyethylenglykole und Alkohole verwendet. Die Kristallisation ist in der Regel ebenfalls abhängig vom pH-Wert der Lösung und der Temperatur. Zur langsamen Veränderung der Konzentration von Protein und Präzipitans wird sehr häufig das Prinzip der Dampfdiffusion angewendet. Nach der Methode des „hanging drop“ wird ein kleines Volumen einer konzentrierten Proteinlösung auf ein

Deckglas aufgebracht und durch Hinzufügen einer konzentrierten Lösung des Präzipitans (Reservoirlösung) verdünnt. Nach Drehen des Deckglases verschließt es eine Vertiefung, in der sich unverdünnte Präzipitans/Puffer-Lösung (Reservoirlösung) befindet. Bei der Kristallisation der *Z. mobilis* TGT wird das in Hochsalzpuffer (2 M NaCl) vorliegende Protein zunächst mit dem gleichen Volumen der Reservoirlösung verdünnt. In der geschlossenen Anordnung des „hanging drop“ Systems kommt es zu einer Dampfdiffusion von Wassermolekülen, da in der proteinhaltigen Lösung eine höhere NaCl-Konzentration als im Reservoir vorliegt. Dieser Prozeß erzeugt ein langsames Präzipitieren der TGT aufgrund der sinkenden NaCl-Konzentration, was durch Zusatz von Polyethylenglykol (PEG 8.000) noch weiter gefördert wird. Die Kristallisation erfolgt optimal bei einem pH-Wert von 8,5 und einer Temperatur von 22°C.

Folgende Bedingungen wurden angewendet (Romier et al., 1996a): 2 µl *Z. mobilis* TGT (10 - 15 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 M NaCl, 0,01 % (w/v) Natriumazid) wurden mit dem gleichen Volumen Kristallisationspuffer (100 mM Tris, pH 8,5, 1 mM DTT, 13 % (w/v) PEG 8.000) auf einem Deckglas vermischt. Das anschließend umgedrehte Deckglas wurde über die Vertiefung einer 24er Kristallisationsplatte (Hampton Research, USA) luftdicht mit Hilfe von Silikonpaste (mittelviskos, Bayer-Silikon) befestigt. In der Vertiefung befanden sich 1000 µl des gleichen Kristallisationspuffers. Die Platte wurde erschütterungsfrei bei 22°C aufbewahrt und nach wenigen Tagen konnten kleine Kristalle geerntet werden. Da diese Kristalle in der Regel zu klein für die Röntgenstrukturanalyse sind, wurde die Technik des Makroseedings zur Züchtung größerer Kristalle angewendet. Dazu wurden identische Bedingungen wie bei der ersten Kristallisation gewählt, jedoch mit einer kleineren PEG-Konzentration (5 % (w/v) anstatt 13 % (w/v)). Das Animpfen der Proteinlösung erfolgte mit einzelnen, regelmäßig gewachsenen Kristallen, die in einem mit Pufferlösung gefüllten „Cryoloop“ (Hampton Research, USA) transferiert wurden. Mit dieser Methode konnten innerhalb weniger Tage hinreichend große Kristalle (0,4 x 0,4 x 0,1 mm³) gezüchtet werden.

4.2.2 Soaking von TGT-Kristallen mit Inhibitoren

Proteinkristalle enthalten in der Regel große Wasserkanäle zwischen den Proteinmolekülen, die eine Diffusion von kleinen Molekülen in die Bindetasche des Proteins („Soaking“) erlauben. Wenn spezifische Wechselwirkungen in der Proteinbindetasche ausgebildet werden (von einem Substrat bzw. Inhibitor), kann der Bindungsmodus des Moleküls durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Da die organischen Verbindungen für ein „Soaking“ häufig zu schlecht in wässrigem Puffer löslich sind, müssen diese zuvor in Dimethylsulfoxid (DMSO) angelöst werden. Das „Soaking“ in der unverdünnten DMSO-Lösung führt in der Regel zum Aufbrechen des eingebrachten Proteinkristalls, so daß ein Verdünnen der DMSO-Lösung mit Puffer erforderlich ist. Die Kristalle der *Z. mobilis* TGT blieben in Pufferlösungen mit bis zu 10 % (v/v) DMSO stabil.

Für das „Soaking“ wurden daher folgende Bedingungen angewendet: die organische Verbindung wurde zunächst in DMSO gelöst und 1:10 (v/v) in Kristallisationspuffer (100 mM Tris, pH 8,5, 1 mM DTT und 5 % (w/v) PEG 8.000) verdünnt. Nach Entfernen eines eventuellen Präzipitats (teilweise wiederausgefallene organische Verbindung) durch Zentrifugation, wurden 10 µl der erhaltenen klaren Lösung auf ein Deckglas pipettiert. Ein ausreichend großer Kristall (Kapitel 4.2.1) der *Z. mobilis* TGT wurde mit Hilfe eines „Cryoloops“ (Hampton Research, USA) in diesen Tropfen transferiert und dort nach der „hanging drop“ Methode (Kapitel 4.2.1) über 1000 µl Reservoirlösung (100 mM Tris, pH 8,5, 1 mM DTT, 5 % (w/v) PEG 8.000 und 10 % (w/v) DMSO) bis zu mehreren Tagen bei 22°C aufbewahrt.

4.2.3 Sammlung von Datensätzen

Die Strukturbestimmung von TGT-Inhibitor-Komplexen erfolgte durch Röntgenbeugung, wobei der Kristall mit einem fokussierten, monochromatischen Röntgenstrahl (Primärstrahl) belichtet wurde. Der Primärstrahl (CuK α -Strahlung, 1,543 Å) wurde mit einem Drehanoden-Generator (Rigaku RU300, MSC, USA) erzeugt, der auf eine Leistung von 50 kV und 100 mA eingestellt war und an einem fokussierenden Spiegelsystem (Yale Mirrors, MSC, USA) ausgerichtet. Die Detektion der Intensitäten abgebeugter Reflexe erfolgte elektronisch (RAXIS-IV Image Plate System, MSC, USA), wobei der Kristall-Detektor-Abstand 100 mm betrug. Zur Aufnahme eines Beugungsbildes wurde der Kristall für 5 min mit dem

Primärstrahl bestrahlt und dabei um 1° gedreht. Zur Minimierung von Strahlungsschäden durch die energiereiche Röntgenstrahlung wurde der Kristall unter kryogenen Bedingungen bei -173°C gemessen. Dazu wurde der Kristall in einem Kryo-Puffer aus 50 mM HEPES (pH 7,5), 16 % (w/v) PEG 8.000 und 20 % (v/v) Glycerin aufgenommen und mit Hilfe eines „Cryoloops“ (Hampton Research, USA) in einem gekühlten Stickstoffstrom (X-stream™, MSC, USA) schockgefroren. Der „Cryoloop“ wurde mit einer magnetischen Halterung auf einem Goniometerkopf (Hampton Research, USA) befestigt und der Kristall im Primärstrahlengang zentriert. Die Datenreduktion erfolgte mit den Programmen DENZO und SCALEPACK (Otwinowski, 1993).

4.2.4 Verfeinerung der Datensätze

Zur Strukturlösung von TGT-Inhibitor-Komplexen wurde die Kristallstruktur der nativen apo-TGT (PDB-Code: **1PUD**) (Romier et al., 1996b) als Startmodell verwendet. Die kristallographische Verfeinerung und die Berechnung der Elektronendichten ($2F_o - F_c$ bzw. $|F_o - F_c|$) von Datensätzen bis zu einer Auflösung von $1,7 \text{ \AA}$ erfolgte mit dem Programm X-PLOR (Brünger, 1998). Das Programm X-PLOR minimiert eine Funktion mit zwei unterschiedlichen Termen, die über eine mathematische Gewichtung gekoppelt sind. Zum einen wird die Abweichung des Modells von der „gemessenen“ Elektronendichte minimiert, die beschrieben ist durch die Differenz der gemessenen und den aus dem Modell berechneten Strukturamplituden. Zum anderen wird ein Energieterm minimiert, der durch die Geometrie der Struktur bestimmt wird. In einem Kraftfeld sind Bindungslängen, -winkel und einige andere energetische Wechselwirkungen parametrisiert. Das in X-PLOR verwendete Kraftfeld basiert auf Parametern, die aus hochaufgelösten Modellstrukturen abgeleitet wurden (Engh & Huber, 1991). In den hier verfeinerten Strukturen befand sich ein Molekül in der asymmetrischen Einheit. Die optimale Positionierung der Strukturen erfolgte in X-PLOR durch „rigid-body“ Minimierung, wobei das Molekül als starre Einheit rotiert und translatiert wurde. In mehreren Zyklen wurde das Modell durch Verfeinerung der individuellen Atompositionen mit Hilfe der konjugierten Gradientenmethode („positional refinement“) soweit verbessert, daß der R-Faktor (Gleichung 4.2.4-1) unter 20 % lag und der Freie-R-Faktor (R_{free}) um nicht mehr als 5 % größer als der R-Faktor war.

Der Freie-R-Faktor (R_{free}) wurde zur Validierung der Verfeinerung verwendet (Brünger, 1992). Dabei wurde ein kleiner Anteil der Röntgendaten (in dieser Arbeit 10 %) nicht in die

Verfeinerung miteinbezogen, jedoch nach jedem Zyklus der R-Faktor nach Gleichung 4.2.4-1 für diesen Anteil berechnet.

Gleichung 4.2.4-1

$$R_{Faktor} = \frac{\sum (|F_{obs.}| - |F_{calc.}|)}{\sum |F_{obs.}|}$$

Darin sind: $F_{obs.}$, beobachtete Strukturamplituden; $F_{calc.}$, berechnete Strukturamplituden.

Der Vergleich der beiden R-Faktoren (R und R_{free}) gibt einen Hinweis über die Qualität des verfeinerten Modells in Bezug auf die experimentellen Röntgendaten. Eine hohe Abweichung zwischen R und R_{free} ($> 5\%$) resultiert häufig aus einer falschen Anpassung („over-fitting“) des Modells an die Daten.

Zur Verfeinerung eines Synchrotron-Datensatzes (1,4 Å Auflösung) wurde das Programm SHELXL (Sheldrick, 1990) verwendet. Die manuellen Korrekturen des Proteinmodells und die Modellierung von Inhibitorstrukturen in die Differenzelektronendichte erfolgte mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991). Für automatische Korrekturen sowie für den Einbau zusätzlicher Wassermoleküle in das Proteinmodell wurde das Programm ARP (Lamzin & Wilson, 1993) verwendet. Die 3D-Strukturen der Inhibitoren wurden mit dem Programmpaket SYBYL (SYBYL, 1999) generiert (Kapitel 4.4) und Parameter- und Topologie-Daten für die X-PLOR-Verfeinerung mit dem Programm MOLEMAN (Kleywegt, 1997) erzeugt.

4.3 Strukturbestimmung von kleinen organischen Molekülen

4.3.1 Kristallisation

Für die Kristallisation von Inhibitoren wurden analoge Bedingungen wie für die *Z. mobilis* TGT gewählt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Inhibitors unter Erwärmen (60°C) in DMSO gelöst und 1:10 (v/v) in 100 mM Tris (pH 8,5), 1 mM DTT und 5 % (w/v) PEG 8.000 verdünnt. Ansätze mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen (10 µl-Tropfen) wurden nach der „hanging drop“-Methode (Kapitel 4.2.1) über 1000 µl des gleichen Kristallisationspuffers bei 22°C aufbewahrt.

4.3.2 Datensammlung

Die Datensammlung erfolgte auf einem Vierkreis-Diffraktometer (Stoe-Siemens-Huber) mit einem CCD-Flächendetektor (Siemens) an der Universität Göttingen (Institut für anorg. Chemie, Arbeitsgruppe Prof. Sheldrick, Fabio Dall’Antonia in Danksagung). Als Meßbedingungen wurden gewählt: Primärstrahl-Wellenlänge 0,71073 Å (Mo-K α -Strahlung), Kristall-Detektor-Abstand 50 mm, Belichtungszeit 120 s, Meßtemperatur -140°C. Zur Datensammlung wurden jeweils vier Phi- und Omega-Scans (Drehwinkel 0,5°) mit dem Programm Siemens SMART (Version 5.050, Siemens) durchgeführt. Die Datenreduktion und Zellverfeinerung erfolgte mit dem Programm Bruker AXS SAINT (Madison 1997), eine Absorptionskorrektur mit dem Programm SADABS (Version 2.0, Sheldrick 1999).

4.3.3 Strukturlösung

Für kleine organische Moleküle erreicht man in der Regel Auflösungen, bei denen die Atome als getrennte Maxima in der Elektronendichte identifizierbar sind. Nach Zuordnung von einzelnen Atomen zu diskreten Maxima in verschiedenen Verfeinerungsstufen werden Auflösungen erreicht, die eine weitgehend gesicherte strukturelle Zuordnung der Protonen erlauben. Die Raumgruppenbestimmung wurde mit dem Programm Bruker AXS XPREP (Version 5.20, Madison 1997) durchgeführt, die Verfeinerung erfolgte mit dem Programm SHELXS (Sheldrick, 1990).

4.4 Generierung von 3D-Strukturen

Zur Erzeugung des 3D-Strukturmodells einer Verbindung kann sowohl auf experimentelle Daten als auch auf quantenchemische bzw. molekülmechanische Rechenmethoden zurückgegriffen werden.

Mit dem Programmpaket SYBYL (SYBYL, 1999) können 3D-Strukturen aufgebaut und anschließend mit einem Kraftfeld minimiert werden. Solche Kraftfeldrechnungen liefern jedoch, abhängig von der gewählten Startgeometrie, das nächstgelegene lokale Minimum auf der vorgegebenen Energiehyperfläche. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die isolierte Betrachtung (im Vakuum) der Moleküle, d.h. intermolekulare Potentiale zum Protein werden nicht berücksichtigt. Die lokale Umgebung eines Moleküls, etwa die Proteinbindetasche oder benachbarte Moleküle in der Kristallpackung, kann die konformativen Eigenschaften signifikant beeinflussen. Daher werden zur Generierung der 3D-Strukturen wissensbasierte Ansätze auf Grundlage experimenteller Strukturdaten bevorzugt.

Die *Cambridge Structural Database* (CSD)² enthält die Kristallstrukturen von über 210.000 organischen und metallorganischen Verbindungen (Stand: Januar 2000). In der *Protein Data Bank* (PDB)¹ werden über 12.000 Protein-Kristallstrukturen bereitgestellt (Stand: Mai 2000), aus denen in vielen Fällen die 3D-Struktur eines Liganden in der Proteinbindetasche entnommen werden kann. Die Vielfalt an experimentellen Strukturdaten dieser Datenbanken wird in wissensbasierten Ansätzen zur Generierung von 3D-Strukturmodellen genutzt. Aus statistischen Häufigkeitsanalysen lassen sich Präferenzen einzelner Molekülfragmente für bestimmte Bindungslängen, -winkel und Torsionswinkel entnehmen. Diese werden von Programmen wie CONCORD (Nicklaus *et al.*, 1993) oder CORINA (Sadowski, 1997) als wissensbasiertes System genutzt, um aus der 2D-Konnektivität eines Moleküls sinnvolle 3D-Strukturen abzuleiten. Mit einem solchen Ansatz kann die Konformationsbestimmung von Molekülen sehr effektiv und damit praktikabel für große Datensätze gestaltet werden (weniger als eine Sekunde Rechenzeit pro Verbindung auf einer gängigen UNIX-Workstation).

² Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge, CB2, UK

<http://www.ccdc.cam.ac.uk/>

4.5 Docking-Methoden

4.5.1 LUDI

Das Computer-Programm LUDI (Böhm, 1992a) wurde zum *de novo*-Design (Kapitel 3.2.2) von Proteinliganden entwickelt. Der Algorithmus platziert kleine Liganden aus einer Datenbank in dem zuvor definierten Bereich der Proteinbindetasche, so daß Wasserstoffbrücken-Bindungen und lipophile Kontakte zu den Proteinatomen ausgebildet werden. Dazu werden regelbasierte Wechselwirkungszentren generiert, die aus statistischen Analysen von Kontaktgeometrien kleiner Moleküle der *Cambridge Structural Database* (CSD) abgeleitet wurden (Böhm, 1992b). LUDI klassifiziert die Proteinatome nach ihrem Atomtyp und der Konnektivität in folgende vier Kategorien:

- (1) H-Donor: alle Wasserstoffatome, die an einem N- oder O-Atom gebunden sind.
- (2) H-Akzeptor: alle N-Atome, die nicht mit einem H-Atom verbunden sind und alle O-Atome.
- (3) Aromatisch: C-Atome der aromatischen Ringe von Phe, Tyr, His und Trp.
- (4) Aliphatisch: alle aliphatischen C-Atome.

Aufgrund der Direktionalität von Wasserstoffbrücken-Bindungen werden die Wechselwirkungszentren für einen H-Donor (D-X) bzw. H-Akzeptor (A-Y) als Vektoren mit einer definierten Länge ($R_{D-X} = 1 \text{ \AA}$ bzw. $R_{A-Y} = 1,23 \text{ \AA}$) dargestellt. Diese Längen korrespondieren näherungsweise mit den experimentellen Bindungslängen der N-H/O-H bzw. C=O Bindung. Die Bereiche für hydrophobe Kontakte werden als Punkte im Raum dargestellt. Die Position eines Wechselwirkungszentrums wird durch den Abstand R , den Winkel α und den Dihedralwinkel ω beschrieben (Abb. 7).

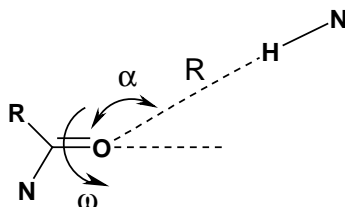


Abb. 7: Die Position eines Wechselwirkungszentrums von LUDI wird durch die geometrischen Parameter R (Abstand), α (Winkel) und ω (Dihedralwinkel) beschrieben.

Für jede funktionelle Gruppe des Proteins werden mehrere Wechselwirkungszentren generiert, da die Kontaktgeometrien aus Kristallpackungen kleiner Moleküle eine breite Verteilung für die Werte von R , α und ω zeigen. Der in LUDI verwendete Abstand zwischen den einzelnen Wechselwirkungszentren für jede Gruppe liegt bei 0,2 - 0,3 Å (Böhm, 1992b). Die Moleküle werden einer Datenbank entnommen und geometrisch (RMS³-Superposition) auf den Wechselwirkungszentren platziert. Das Hilfsprogramm GENFRA analysiert zunächst die Atomtypen von Molekülen, weist ihnen Eigenschaften wie H-Brücken-Donor, -Akzeptor oder lipophile Gruppe zu und schreibt sie als Einträge in eine Datenbank weg. Anschließend werden automatisch daraus diejenigen Atome ausgewählt, die zur Plazierung verwendet werden (Abb. 8).

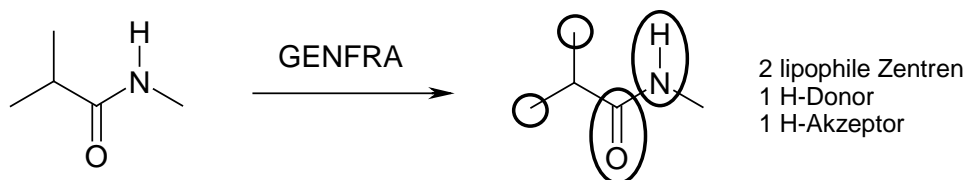


Abb. 8: Das Hilfsprogramm GENFRA analysiert die Moleküle aus der Datenbank und identifiziert diejenigen Atomtypen, die zur Plazierung auf die Wechselwirkungszentren von LUDI verwendet werden. In diesem Beispiel identifiziert GENFRA 2 lipophile Zentren, 1 H-Donor und 1 H-Akzeptor.

Die Plazierung eines Moleküls wird mit einer einfachen Scoring-Funktion (Kapitel 4.6.1) bewertet und als Hit klassifiziert, u.a. wenn keine van-der-Waals Überlappung bzw. elektrostatische Abstoßung mit Proteinatomen vorliegt. Zu Beginn einer Datenbanksuche mit LUDI definiert der Benutzer ein Zentrum und einen Radius innerhalb der Bindungstasche, um diejenigen funktionellen Gruppen auszuwählen, die bei der Generierung der Wechselwirkungszentren von LUDI berücksichtigt werden sollen. Die Gesamtzahl der zur Datenbanksuche verwendeten H-Donoren bzw. H-Akzeptoren und lipophile Zentren kann als Eingabe-Parameter verändert werden. Dabei besteht in der Regel ein Einfluß dieser Parameter auf die Quantität und Qualität der gefundenen Datenbank-Hits. Eine restriktive Definition der

³ Definition des RMS (engl. root mean square)-Wertes:

$$RMS = \sqrt{\left(\sum_i^n d_i^2 \right) / n}$$

d: Abstand korrespondierender Atome

n: Anzahl der Atome

Wechselwirkungszentren reduziert die Anzahl der Hits, während eine zu breite Definition in einer Vielzahl von Hits resultiert, was zu einem Problem bei der Auswahl der interessanten Hits führen kann.

Da die Wasserstoffatome der Liganden für das Docking mit LUDI verwendet werden, muß der Protonierungszustand festgelegt werden (z.B. Carboxylatgruppen, Phosphate und Sulfate deprotoniert; Amine, Amidine und Guanidingruppen protoniert). Entscheidende Vereinfachungen in LUDI sind die Annahme einer rigiden Bindetasche, sowie die Beschränkung auf kleine Liganden mit begrenzter Flexibilität. Ein großer Vorteil von LUDI ist die einfache Generierung von Wechselwirkungszentren in der Bindetasche, die einen ersten Ansatz für ein Pharmakophormodell geben können.

4.5.2 FlexX

Der Docking-Algorithmus in FlexX (Rarey et al., 1996) verfolgt eine sequentielle Strategie zum Einpassen von Liganden in eine definierte Proteinbindetasche. Zunächst erfolgt die Auswahl eines Basisfragmentes, also ein Baustein des Liganden, der möglichst viele directionale Wechselwirkungen in der Bindetasche eingehen kann. Dieses Basisfragment wird von FlexX unabhängig vom Rest des Liganden in alternativen Bindungsposen innerhalb der Bindetasche platziert. Ausgehend von den einzelnen Plazierungen des Basisfragmentes wird der Ligand schrittweise durch Anfügen der verbleibenden Fragmente des Liganden in der Bindetasche aufgebaut.

Die Auswahl des Basisfragmentes erfolgt automatisch, wobei solche Fragmente bevorzugt werden, die bei möglichst vielen Wechselwirkungen zum Protein eine geringe Zahl von Konformationen annehmen. Die Platzierung der Basisfragmente ist u.a. abhängig von der Zahl ihrer möglichen Wechselwirkungen in der Bindetasche. Andererseits erhöht sich die Rechenzeit, wenn mehrere Konformationen des Basisfragmentes berücksichtigt werden müssen. Für die Basisfragmente werden bis zu 30 Konformere erzeugt und zur Platzierung der einzelnen Konformere werden potentielle Protein-Ligand-Wechselwirkungen analysiert. Berücksichtigt werden dabei gerichtete Interaktionen (Wasserstoffbrücken-Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen) mit definierter Geometrie. Jedem Basisfragment werden denkbare Wechselwirkungszentren zugewiesen und jeweils drei solche Zentren in Dreiecksbeziehungen gebracht. Um die funktionellen Gruppen des Proteins werden denkbare Wechselwirkungszentren generiert. Anschließend werden verschiedene dieser so erzeugten Zentren zu Dreiecken zusammengefaßt. Immer wenn ein kongruentes Dreieck auf dem

Liganden und in der Bindetasche gefunden wird, versucht der Docking-Algorithmus eine Platzierung des Basisfragments. Anschließend werden ähnliche Platzierungen eines Basisfragmentes zusammengefaßt, wobei als Kriterium die räumliche RMS-Abweichung der Fragmente berechnet wird. Die sterische Überlappung der Basisfragmente mit Proteinatomen wird ausgeschlossen und die freie Bindungsenergie der konfliktfreien Platzierung mit Hilfe einer empirischen Bewertungsfunktion (Kapitel 4.6.1) abgeschätzt.

Die energetisch am besten bewerteten Platzierungen der gewählten Basisfragmente werden für den weiteren Aufbau der Protein-Ligand-Komplexe verwendet. Der sequentielle Aufbau des gesamten Liganden erfolgt unter Berücksichtigung aller alternativen Verknüpfungsmöglichkeiten des nächsten Fragmentes. Nach Platzierung des Basisfragmentes werden schrittweise entlang eines Entscheidungsbaums weitere starre Fragmente angefügt. An jeder Verknüpfungsstelle werden weitere Torsionswinkel auf einem diskreten Raster durchprobiert. Als Winkelwerte werden solche Werte eingestellt, die sich aufgrund statistischer Auswertungen der Konformationen niedermolekularer Verbindungen in Kristallstrukturen als günstig abzeichnen (Klebe & Mietzner, 1994). Die Prüfung aller Konformere des zu verknüpfenden Fragmentes ergibt eine baumartige Suchstrategie, wobei jeder Pfad entlang des Baums eine alternative Position des Liganden in der Bindetasche erzeugt. Nach Ausschluß der Pfade, die zu sterisch ungünstigen Platzierungen führen, werden die Wechselwirkungen der Fragmente aus den übrigen Pfaden in der Bindetasche analysiert. Dazu wird die freie Bindungsenergie des gesamten Liganden, der sich aus der Verknüpfung der partiellen Fragmente ergeben würde, abgeschätzt. Die so selektierten partiellen Liganden werden zusammengefaßt und in den nächsten Zyklus übernommen.

Der Komplex-Aufbau läuft weiter, bis alle Fragmente addiert worden sind und der gesamte Ligand in der Bindetasche platziert wurde. Die freie Bindungsenergie der gefundenen Platzierung wird mit der empirischen Bewertungsfunktion (Kapitel 4.6.1) abgeschätzt und die besten Ergebnisse in einer Rangliste angeordnet.

Das Programm FlexX wurde anhand von 200 kristallographisch ermittelten Protein-Ligand-Komplexen getestet (Rarey et al., 1996). Dabei wurde der experimentell gefundene Bindungsmodus in 81 % der Fälle mit einer RMS-Abweichung $< 2,0 \text{ \AA}$ reproduziert, in 62 % der Fälle wurden noch bessere Vorhersagen gefunden (RMS-Abweichung $< 1,0 \text{ \AA}$). Die Methode ist schnell, alle betrachteten Liganden wurden innerhalb von drei Minuten auf einer derzeit üblichen Workstation (Silicon Graphics O₂, R5.000 Prozessor) gedockt.

4.6 Scoring-Verfahren

4.6.1 Scoring-Funktion in LUDI und FlexX

Die Scoring-Funktion in LUDI (SCORE 1) wurde ursprünglich von Böhm (Böhm, 1994a) entwickelt und in einer modifizierten Form in FlexX (Rarey et al., 1996) implementiert (Gleichung 4.6.1-1).

Gleichung 4.6.1-1

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{binding}} = & \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} \cdot N_{\text{rot}} + \Delta G_{\text{hb}} \sum_{\text{h-bonds}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{ionic}} \sum_{\text{ionic int.}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \\ & + \Delta G_{\text{aromatic}} \sum_{\text{aromatic int.}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{lipo}} \sum_{\text{lipo. cont.}} f^*(\Delta R) \end{aligned}$$

- $f(\Delta R, \Delta \alpha)$ ist eine Funktion, die starke Abweichungen von der idealen Wechselwirkungs-Geometrie bestraft. Sie toleriert kleine Abweichungen bis zu 0,2 Å und 30° von der Ideal-Geometrie, da Abweichungen in dieser Größenordnung aufgrund der inhärenten Ungenauigkeiten in den Kristallstrukturen berücksichtigt werden müssen.
- ΔG_0 ist ein Beitrag zur Bindungsenergie, der nicht direkt von spezifischen Wechselwirkungen mit dem Protein abhängt. Man kann ihn mit dem Teil der Freien Bindungsenergie gleichsetzen, der aufgrund des Verlustes translatorischer und rotatorischer Entropie der den Komplex bildenden Reaktionspartner entsteht.
- ΔG_{rot} beschreibt den Beitrag zur Freien Bindungsenergie, der aufgrund des Einfrierens interner Freiheitsgrade des Liganden auftritt. N_{rot} ist die Anzahl der frei drehbaren Bindungen, die im Komplex fixiert werden.
- ΔG_{hb} beschreibt den Beitrag idealer Wasserstoffbrücken-Bindungen.
- ΔG_{ion} steht für den Beitrag ungestörter ionischer Wechselwirkungen.

Alle diese Parameter wurden ursprünglich von Böhm an einem Datensatz von 45 Protein-Ligand-Komplexen kalibriert und in die Bewertungsfunktion übernommen ($\Delta G_0 = + 5,4$ kJ/mol, $\Delta G_{\text{rot}} = + 1,4$ kJ/mol, $\Delta G_{\text{hb}} = - 4,7$ kJ/mol, $\Delta G_{\text{ion}} = - 8,3$ kJ/mol, $\Delta G_{\text{lipo}} = - 0,17$ kJ/mol). Hinzu gekommen ist der neue Parameter $\Delta G_{\text{aromatic}} = - 0,7$ kJ/mol, der den Beitrag von gerichteten Wechselwirkungen zwischen aromatischen Gruppen beschreibt (Rarey et al., 1996). Der letzte Term der Gleichung 4.6.1-1 beschreibt den Beitrag lipophiler

Wechselwirkungen als Summe über alle paarweisen Atom-Atom-Kontakte. Hierbei wird die Abweichung ΔR vom Ideal-Abstand der Atome, für den die Summe der um $0,6 \text{ \AA}$ vergrößerten van-der-Waals-Radien angenommen wird, durch die Funktion $f^*(\Delta R)$ berücksichtigt (Gleichung 4.6.1-2).

Gleichung 4.6.1-2

$$f^*(\Delta R) = \begin{cases} 0 & \Delta R > 0,6 \text{ \AA} \\ 1 - \frac{\Delta R - 0,2}{0,4} & 0,2 \text{ \AA} < \Delta R \leq 0,6 \text{ \AA} \\ 1 & -0,2 \text{ \AA} < \Delta R \leq 0,2 \text{ \AA} \\ 1 - \frac{-\Delta R - 0,2}{0,4} & -0,6 \text{ \AA} < \Delta R \leq -0,2 \text{ \AA} \\ \frac{\Delta R + 0,6}{0,2} & R \leq -0,6 \text{ \AA} \end{cases}$$

4.6.2 DrugScore

Die Scoring-Funktion DrugScore (Gohlke et al., 2000) enthält distanzabhängige Atompaar-Präferenzen sowie von der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche abhängige Einteilchen-potentiale, die den Solvens-Beitrag zur Gibbschen Freien Enthalpie bei der Bildung von Protein-Ligand-Komplexen liefert (Kapitel 3.2.3). Die statistischen Präferenzen W wurden aus experimentellen Protein-Ligand-Komplexen abgeleitet und in Form von inversen Boltzmann-Verteilungen berücksichtigt (Gleichung 4.6.2-1):

Gleichung 4.6.2-1

$$W = -\ln \frac{g_{\text{beobachtete Häufigkeit}}}{g_{\text{erwartete Häufigkeit}}}$$

Die distanzabhängigen Atompaar-Präferenzen (zwischen Protein- und Ligandatom) werden mit Gleichung 4.6.2-2 berechnet:

Gleichung 4.6.2-2

$$\Delta W_{i,j}(r) = W_{i,j}(r) - W(r) = -\ln \frac{g_{i,j}(r)}{g(r)}$$

Darin ist $g_{i,j}(r)$ eine normalisierte, radiale Paar-Verteilungsfunktion für Atome des Typs i und j , deren Abstand im Intervall r und $r + dr$ liegt. Die Verteilungsfunktion $g(r)$ beschreibt zwei

beliebige Atome im gleichen Abstandsintervall und entspricht somit einer Referenz, die alle nichtspezifischen Beiträge von Atompaaren in einer Proteinumgebung enthält. Die statistische Präferenz $\Delta W_{i,j}$ ergibt sich aus der Differenz zwischen den mittleren statistischen Präferenzen des Subsystems i, j ($W_{i,j}$) und dem Referenzsystem (W). Der maximale Abstand von r wurde auf 6 Å beschränkt, so daß in dieser Gleichung Wechselwirkungen zwischen Atompaaren ausgeschlossen werden, an denen ein verbrückendes Wassermolekül beteiligt ist.

Der Beitrag aus der Vergrabung der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche wird aus einer getrennten Betrachtung von Potentialen, die nur von einem Atomtyp abhängen, für Ligand und Protein abgeleitet (Gleichung 4.6.2-3):

Gleichung 4.6.2-3

$$\Delta W_i(SAS, SAS_0) = W_i(SAS) - W(SAS_0) = -\ln \frac{g_i(SAS)}{g_i(SAS_0)}$$

Darin ist g_i die normalisierte Verteilungsfunktion der Oberfläche eines Atoms i im vergrabenen Zustand (SAS) des Liganden in einem Protein-Ligand-Komplex. Diese Funktion wird mit der Oberfläche im solvatisierten Zustand (SAS_0) verglichen, wobei sich $g_i(SAS_0)$ im Gegensatz zu $g_{i,j}(r)$ aus Gleichung 4.6.2-2 nicht auf ein Atompaar i und j , sondern nur auf das Atom i bezieht. In $\Delta W_i(SAS, SAS_0)$ werden solche Prozesse nicht berücksichtigt, in denen polare Anteile des Liganden aus einem polaren Lösungsmittel in eine polare Proteinumgebung überführt werden.

Die Gesamt-Präferenz ΔW eines Protein-Ligand-Komplexes ergibt sich aus der Summe der Einzelbeiträge $\Delta W_{i,j}$ und $\Delta W_i(SAS, SAS_0)$:

Gleichung 4.6.2-4

$$\Delta W = \gamma \sum_{k_i} \sum_{l_j} \Delta W_{i,j}(r) + (1 - \gamma) \cdot \left[\sum_{k_i} \Delta W_i(SAS, SAS_0) + \sum_{l_i} \Delta W_j(SAS, SAS_0) \right]$$

Der Gewichtungsfaktor γ wurde empirisch auf 0,5 optimiert.

4.7 Datenbank-Suchen

Die Suche nach Leitstrukturen und Strukturfragmenten wurde in dem *Available Chemical Directory* (ACD) vorgenommen, einer Datenbank mit über 180.000 (Stand: Juli 1998) kommerziell erhältlichen bzw. synthetisierbaren Verbindungen (MDL, 1997).

Zur ersten Leitstruktur-Suche mit LUDI (Kapitel 4.5.1) wurde die gesamte ACD verwendet, da der Suchalgorithmus von LUDI sowie die integrierte Scoring-Funktion (Kapitel 4.5.1) eine schnelle Auswahl möglicher Hits erlaubte (etwa 10 h für 180.000 Verbindungen). Die Verbindungen der ACD sowie weiterer Datenbanken wurden mit dem Programm GENFRA (Kapitel 4.5.1) für die Suche mit LUDI aufbereitet.

In weiteren Datenbanksuchen wurden einschränkende Kriterien (Filter) miteinbezogen, um den Rechenaufwand aufgrund speziellerer Suchkriterien durch eine Vorauswahl der Verbindungen zu reduzieren. Dazu wurde das Programm UNITY (UNITY, 2000) benutzt, das in der SYBYL-Version 6.6 (SYBYL, 1999) integriert ist. Die Suche wurde aus dem Dialogfenster ($\rightarrow \text{UNITY}^4 \rightarrow \text{UNITY SEARCH}$) heraus gestartet, wobei die Art der Suche (*2D SEARCH*, *3D SEARCH*, *FLEX SEARCH*) sowie die verwendete Datenbank angegeben werden mußte.

Im ersten Schritt erfolgte eine 2D-Topologie-Suche, wobei auf eine vorgegebene Konnektivität zwischen bestimmten Atomen in der ACD selektiert wurde. Durch eine Filterfunktion (Angabe bestimmter Grenzwerte z.B. für Molekülmasse, Chiralität, Anzahl der Ringe, Metallatome) mit dem Programm SELECTOR (Selector, 1996) wurde die Zahl der Datenbank-Hits für die abschließende 3D-Suche mit UNITY reduziert. Die gesuchte Konnektivität der Atome wurde durch Verwendung der *Sybyl Line Notation* (SLN)⁵ spezifiziert. Die SLN-Codes berücksichtigen, daß in der Datenbank alle Moleküle im ungeladenen Zustand gespeichert sind. Datenbank-Hits wurden in eine Trefferliste („hitlist“) oder Tabelle („spreadsheet“) abgelegt und für die weitere Suche verwendet. Als 3D-Suchkriterium diente dabei ein atombasierender Pharmakophor aus mindestens drei Pseudoatomen (z.B. H-Brücken-Donor, -Akzeptor, hydrophobes Zentrum). Vorgegeben wurden die relativen Abstände und Winkel zwischen diesen Atomen bzw. Pseudoatomen innerhalb bestimmter Toleranzgrenzen. Die Auswahl erfolgte aufgrund von Vorstellungen über ein bestimmtes Strukturmuster, das potentielle Inhibitoren zur spezifischen Bindung in

⁴ SYBYL-Befehle sind *KURSIV* dargestellt.

⁵ Für weitere Erläuterungen zu SLN siehe *Tripes SLN Manual*.

der vorliegenden Proteinbindetasche erfüllen sollten. Beim Vergleich der Datenbank-Einträge mit diesen Bedingungen im Raum wurde überprüft, ob die Datenbank-Einträge in der Lage waren, die vorgegebenen Bedingungen in irgendeiner denkbaren Konformation zu erfüllen. Für die 3D-Suche wurden die Trefferlisten aus der 2D-Suche verwendet (\rightarrow UNITY \rightarrow UNITY SEARCH \rightarrow FLEX SEARCH).

Zur weiteren Einschränkung der Suche wurde der zur Ligandbindung verfügbare Raum in der Bindetasche durch Definition von „excluded volumes“ miteinbezogen.

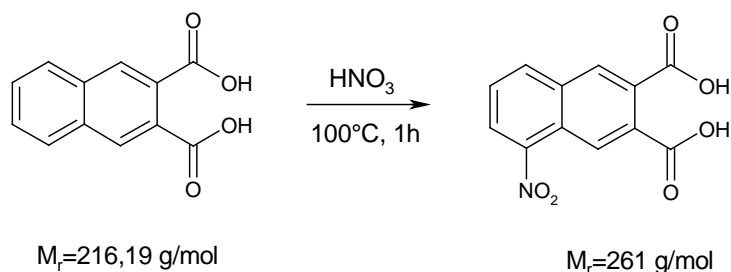
Nach erfolgter Reduktion der Datenbank-Einträge wurden die Moleküle bzw. Molekülfragmente zum Docking mit FlexX (Kapitel 4.5.2) vorbereitet und die Ergebnisse mit der Scoring-Funktion DrugScore (Kapitel 4.6.2) bewertet.

4.8 Inhibitor-Synthese

4.8.1 Synthese von 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid

Die Synthese von 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid erfolgte in vier Stufen aus Naphthalin-2,3-dicarbonsäure (Sigma) teilweise nach Literaturvorschriften (Drew & Garwood, 1939) (Baker, 1934).

4.8.1.1 Synthese von 5-Nitronaphthalin-2,3-dicarbonsäure

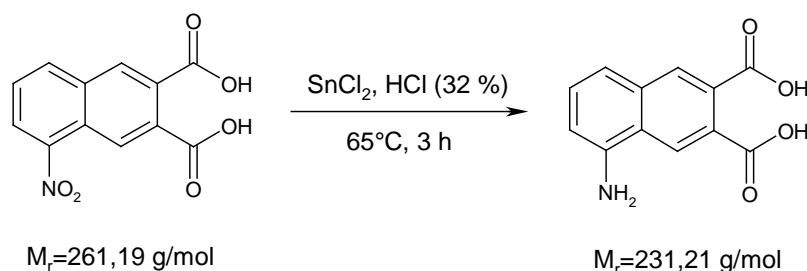


5 g (23 mmol) Naphthalin-2,3-dicarbonsäure (Sigma) wurden mit 15 ml (216 mmol) Salpetersäure (65 %, $d = 1,42 \text{ g/l}$) 1 h refluxiert. Nach Zugabe von 30 ml Wasser wurde der Feststoff abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Nach Umkristallisierung des Rohproduktes aus 30 %iger Essigsäure ($\sim 130 \text{ ml}$) erhielt man 5 g (19 mmol, 83 % Ausbeute) eines hellgelben Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -Aceton, 500 MHz)

δ [ppm]: 7,89 - 8,06 (m, 1H); 8,48 - 8,51 (m, 2H); 8,56 (s, 1H); 8,96 (s, 1H)

4.8.1.2 Synthese von 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäure

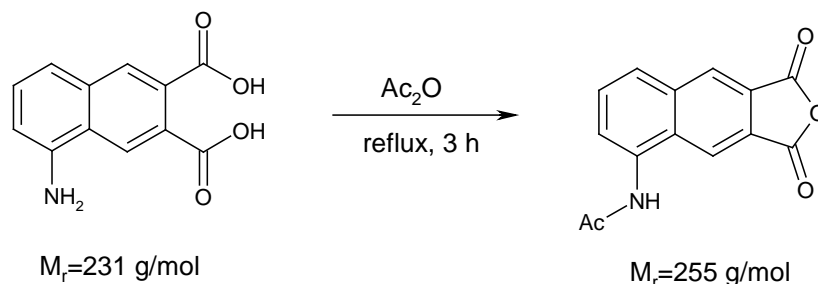


1,31 g (5 mmol) 5-Nitronaphthalin-2,3-dicarbonsäure wurden zusammen mit 3,40 g Zinn(II)chlorid in 25 ml HCl (32 %) 3 h bei 65°C gerührt. Nach Zugabe von 70 ml Diethylether wurde unter Eis/Kochsalz-Kühlung (-10°C) noch 15 min weitergerührt. Nach Absaugen des Niederschlages mit 10 ml Diethylether-gesättigter HCl, sowie zweimal mit Diethylether nachgewaschen und bei 90 - 100°C im Trockenschrank getrocknet. Es verblieben 1,05 g (4,5 mmol, 91 % der Theorie) eines weißen Feststoffes.

¹H-NMR (d₆-DMSO, 500 MHz)

δ [ppm]: 7,43 (d, 1H); 7,57 (t, 1H); 7,76 (d, 1H); 8,25 (s, 1H); 8,46 (s, 1H)

4.8.1.3 Synthese von 5-(N-Acetylamino)-naphthalin-2,3-dicarbonsäureanhydrid

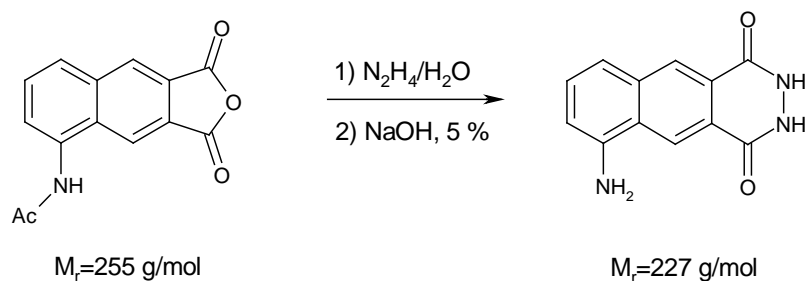


300 mg (1,3 mmol) 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäure wurden in 10 ml Essigsäureanhydrid 3 h refluxiert. Anschließend wurde das Essigsäureanhydrid im Vakuum entfernt und der Rückstand in tert.-Butylmethylether (TBME)/Hexan (1:3) resuspendiert und gerührt. Nach Absaugen und Trocknen im Vakuum erhielt man 300 mg (1,2 mmol, 92 % Ausbeute) eines schmutzigweißen Feststoffes.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz)

δ [ppm]: 2,35 (s, 1H); 7,68 (dd, 1H); 7,91 (dd, 1H); 8,26 (d, 1H); 8,40 (s, 1H);
8,67 (s, 1H)

4.8.1.4 Synthese von 5-Aminonaphththalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid



300 mg (1,2 mmol) 5-(N-Acetylamino)-naphththalin-2,3-dicarbonsäureanhydrid und 0,5 ml Hydrazinhydrat (80 %, 10 mmol) wurden in 10 ml Eisessig 1 h refluxiert. Nach Zugabe von 15 ml Wasser wurde der Feststoff abgesaugt, in 30 ml Natronlauge (5 %) gelöst und 3 h gekocht. Nach Versetzen von 20 ml 25 %iger Essigsäure wurde der Feststoff abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhielt 200 mg (0,88 mmol, 63 % Ausbeute) eines braunschwarzen Feststoffes.

¹H-NMR (d₆-DMSO, 500 MHz)

δ [ppm]: 4,6 (m); 6,83 (m, 1H); 7,37 (m, 2H); 8,49 (s, 1H); 8,91 (s, 1H)

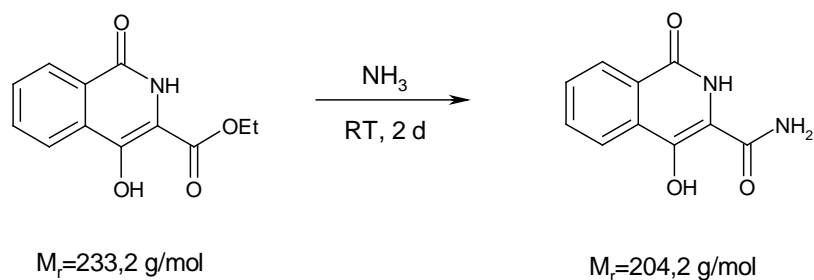
¹³C-NMR (d₆-DMSO, 100 MHz)

δ [ppm]: 108,5; 116,0; 121,4; 123,3; 124,0; 124,9; 125,7; 129,0; 135,2; 146,0; 156,0;
156,6

Massenspektrum: m/z (%) = 225 (31, M⁺ - 2)

4.8.2 Synthese von 4-Hydroxy-1(2H)-isochinolon-3-carbonsäureamid

Die Synthese von 4-Hydroxy-1(2H)-isochinolon-3-carbonsäureamid erfolgte in einer Stufe aus 4-Hydroxy-1(2H)-isochinolon-3-carbonsäureethylester (Sigma) nach einer Literaturvorschrift (Schapira *et al.*, 1985).



50 mg (0,21 mmol) 4-Hydroxy-1(2H)-isochinolon-3-carbonsäureethylester (Sigma) in 50 ml Ammoniak (25 %) wurden 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend der Großteil des Ammoniaks im Vakuum entfernt. Die verbleibende Lösung wurde in eine Eis/HCl-Mischung eingegossen, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Nach Umkristallisieren des Rohproduktes aus Ethanol erhielt man 30 mg (0,14 mmol, 67 % Ausbeute) eines weißen Feststoffs.

Massenspektrum: m/z (%) = 225 (100, M^+)

4.9 Messung von pK_a -Werten

Die pK_a -Werte von verschiedenen Verbindungen wurden mit dem PCA101-Partition Coefficient Analyzer von Sirius Analytical Instruments (Forest Row, England) gemessen. Die Silber-Silberchlorid pH-Elektrode wurde nach der FOUR-PLUS Standardisierung kalibriert (Aveef & Bucher, 1978). Der Inhibitor wurde in Dioxan gelöst und mit Wasser verdünnt, wobei die resultierende Lösung eine Kaliumchlorid-Konzentration von 0,15 M enthielt. Nachdem die Lösung mit 0,5 M Salzsäure auf den unteren pH-Meßbereich eingestellt wurde, erfolgte die Titration mit 0,5 M Kalilauge bis zum Erreichen des oberen pH-Meßbereichs. Bei einer Einwaage einer vorgegebenen Menge Substanz konnte innerhalb eines pH-Bereiches von 1,8 bis 12,8 gemessen werden. Alle Messungen wurden bei 25°C unter einer Argon-Atmosphäre durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen der Verbindungen lagen zwischen 1 und 5 mM. Aus den Daten wurde zunächst durch nichtlineare Kurvenanpassung ein pK_a -Wert abgeschätzt, der in weiteren Anpassungszyklen unter Verwendung verschiedener Korrekturfaktoren (Einwaage, CO_2 -Gehalt) mit dem Windows-Programm pKalogP verfeinert wurde (Avdeef *et al.*, 1982).

5 Ergebnisse

Alle Rechnungen wurden auf Silicon Graphics O2 (R5.000 Prozessor) oder Octane (R10.000) Workstations durchgeführt. Die 3D-Strukturmodelle von Inhibitoren zur kristallographischen Verfeinerung (Kapitel 4.2.4.) von TGT-Inhibitor-Komplexen wurden mit dem Programmpaket SYBYL (SYBYL, 1999) generiert (Kapitel 4.4). Alle Synthesen, die in diesem Kapitel behandelt werden, wurden von Hans-Dieter Gerber (Philipps-Universität Marburg, Inst. für pharmazeutische Chemie, AG Klebe) durchgeführt.

5.1 Studien mit Mutanten der *Z. mobilis* TGT

5.1.1 Charakterisierung der S103A-Mutante der *Z. mobilis* TGT

Eine *Escherichia coli* Mutante wurde beschrieben, deren tRNA kein Queuosin enthielt (Noguchi *et al.*, 1982). Dieser Queuosin-Mangel war auf eine Punktmutation (Serin-90-Phenylalanin) des *tgt*-Gens zurückzuführen, die in einer inaktivierten TGT resultierte (Reuter *et al.*, 1994). In weiteren Studien wurde das Ser⁹⁰ der *E. coli* TGT gezielt gegen verschiedene Aminosäuren ausgetauscht und die Aktivität des gereinigten Enzyms bestimmt. Dabei konnte in einer Serin-90-Cystein Mutanten ein deutlich erhöhter K_m -Wert für Guanin bzw. tRNA und dadurch eine reduzierte Aktivität beobachtet werden. Die Mutation des Ser⁹⁰ in Alanin führte hingegen zu einer dramatischen Reduktion der Enzymaktivität. In dieser Mutanten war der v_{max}/K_m -Wert, ein Maß für die katalytische Effizienz eines Enzyms, um vier Größenordnungen kleiner verglichen mit dem Wildtyp (Reuter *et al.*, 1994). Die Sequenzanalyse der *Z. mobilis* TGT ergab, daß Ser¹⁰³ dem Ser⁹⁰ der *E. coli* TGT entspricht (Reuter & Ficner, 1995). Die Analyse der Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT zeigte, daß Ser¹⁰³ eine schwache Wasserstoffbrücke (3,5 Å) zu der exozyklischen NH₂-Gruppe des preQ₁ (**3**) bildet. Aufgrund des großen Abstands (~ 7 Å) zu dem N7-Atom von preQ₁ wurde das Ser¹⁰³ jedoch als aktives Nukleophil in der Basenaustausch-Reaktion ausgeschlossen (Romier *et al.*, 1996c; Romier *et al.*, 1996b). Obwohl diese Aminosäure nicht direkt am Basenaustausch beteiligt zu sein scheint, ist sie in Aminosäure-Sequenzen aller bekannten TGTs aus Prokaryoten, Eukaryoten und Archaeobakterien, die unterschiedliche Substrat-Spezifitäten haben, konserviert (Romier *et al.*, 1997). Zur Aufklärung der Rolle von Ser¹⁰³ in der Katalyse sollte im Rahmen dieser Arbeit

die Ser-103-Ala Mutante der *Z. mobilis* TGT, im folgenden als TGT(S103A) bezeichnet, biochemisch und kristallographisch untersucht werden.

5.1.1.1 Konstruktion und Reinigung von TGT(S103A)

Die ortsspezifische Mutagenese erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR, Kapitel 4.1.4.9) unter Verwendung des Überexpressionsplasmids pETZM4 (Reuter & Ficner, 1995) der *Z. mobilis* TGT und den Oligonukleotiden S103A-s und S103A-a (Tab. 4), die das Basenkodon für Ala¹⁰³ enthielten. Zur Minimierung der Fehlerrate bei der PCR wurde ein optimiertes Protokoll für die ortsspezifische Mutagenese angewendet (Ansaldi *et al.*, 1996). Nach Reinigung der DNA-Fragmente aus dem PCR-Ansatz (Kapitel 4.1.4.6) wurden diese in kompetente Zellen (*E. coli* XL2-blue, Tab. 2, Kapitel 4.1.3) transformiert (Kapitel 4.1.4.8) und die Transformanten auf Kanamycin-Agarplatten (Kapitel 4.1.2) selektioniert. Die Transformation brachte 3 Klone hervor, von denen einer nach DNA-Sequenzanalyse (Kapitel 4.1.5) das gewünschte Plasmid mit der Ser-103-Ala Mutation enthielt. Das resultierende Plasmid pETZM4-S103A wurde in kompetente Zellen (*E. coli* BL21(DE3) pLysS, Tab. 2, Kapitel 4.1.3) transformiert (Kapitel 4.1.4.8) und nach Überexpression und Reinigung (Kapitel 4.1.7) die *Z. mobilis* TGT(S103A) erhalten (Grädler *et al.*, 1999).

5.1.1.2 Biochemische Charakterisierung von TGT(S103A)

Die TGT(S103A) ließ sich analog zum Wildtyp exprimieren und reinigen und zeigte auf dem SDS-Polyacrylamidgel (Kapitel 4.1.7.5) eine Bande bei etwa 42 kDa. Die kinetischen Parameter der TGT(S103A) wurden im Enzymassay bestimmt (Kapitel 4.1.8.1). Der 400 µl-Reaktionsansatz enthielt jeweils 20 µM [8-³H]-Guanin bzw. tRNA^{Tyr} und 800 nM TGT(S103A). Zur Kontrolle wurde ein analoger Versuch mit 0,4 µM [³H]-Guanin, 20 µM tRNA^{Tyr} und 80 nM TGT (w.t.) durchgeführt. Aus den erhaltenen Anfangsgeschwindigkeiten (TGT(S103A): 2,7·10⁻³ µM/min und TGT (w.t.): 13,6·10⁻³ µM/min) wurden mit den Gleichungen 4.1.8.1-2 und 4.1.8.1-3 (Kapitel 4.1.8.1) v_{\max} bzw. k_{cat}/K_m für den Wildtyp berechnet:

$$v_{\max} = \frac{v_i \cdot (K_m + [S]_i)}{[S]_i} = \frac{13,6 \cdot 10^{-3} \cdot (0,38 + 0,4) \mu\text{M} / \text{min}}{0,4} = \underline{26,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{M} / \text{min}}$$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{v_{max}}{K_m \cdot [E]_t} = \frac{26,5 \cdot 10^{-3} \mu M / \min}{0,38 \mu M \cdot 0,08 \mu M \cdot 60 s / \min} = 1,4 \cdot 10^{-3} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$$

Darin sind: $[S]_i$, $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guanin-Konzentration; $[E]_t$, TGT(w.t.)-Konzentration; v_i , Anfangsgeschwindigkeit bei $[S]_i$; v_{max} , maximale Anfangsgeschwindigkeit bei sättigender Substratkonzentration $[S]_i$; K_m , Michaelis-Konstante.

Die TGT(S103A) Mutante zeigte eine sehr geringe Restaktivität selbst bei hohen Substrat- und Enzymkonzentrationen, so daß aufgrund des hohen experimentellen Fehlers dieser geringen Aktivitätswerte eine zuverlässige Bestimmung von v_{max} und K_m nicht möglich war. Wie zuvor beschrieben (Reuter et al., 1994), konnte jedoch der k_{cat}/K_m -Wert von TGT(S103A) aus der gemessenen Anfangsgeschwindigkeit und der eingesetzten Substrat- und Enzymkonzentration abgeschätzt werden:

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{v_i}{[S]_i \cdot [E]_t \cdot 60 s / \min} = \frac{2,7 \cdot 10^{-3} \mu M / \min}{20 \mu M \cdot 0,8 \mu M \cdot 60 s / \min} = 2,8 \cdot 10^{-6} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$$

Darin sind: $[S]_i$, $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guanin-Konzentration; $[E]_t$, TGT(S103A)-Konzentration; v_i , Anfangsgeschwindigkeit bei $[S]_i$.

Der k_{cat}/K_m -Wert für TGT(S103A) lag bei $2,8 \cdot 10^{-6} \mu M^{-1} s^{-1}$ und damit um etwa drei Größenordnungen niedriger als k_{cat}/K_m für den Wildtyp ($1,4 \cdot 10^{-3} \mu M^{-1} s^{-1}$).

In einem weiteren biochemischen Experiment wurde überprüft, ob die Serin-103-Alanin Mutante wie der Wildtyp in der Lage ist, einen kovalenten Komplex mit $tRNA^{Tyr}$ zu bilden. Analog zu einer früheren Studie (Romier et al., 1996c), in der die Mutanten Asp-102-Ala, Asp-156-Ala und Asp-156-Tyr untersucht wurden, sollte ein Gelshift-Experiment (Kapitel 4.1.7.7) mit Ser-103-Ala durchgeführt werden. Dazu ließ man TGT(S103A) bei 37°C für 1 h mit einem 20-fachen Überschuß von *E. coli* $tRNA^{Tyr}$ -(G34) inkubieren. Als Kontrollen wurden Ansätze mit TGT (w.t.) und $tRNA^{Tyr}$ sowie die einzelnen Komponenten (TGT(S103A), TGT (w.t.) und $tRNA^{Tyr}$) unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Proben wurden nach erfolgter Inkubation sofort auf einem nativen SDS-Polyacrylamidgel (Kapitel 4.1.7.5 und 4.1.7.7) aufgetrennt. Dabei wurde ein Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol verwendet, da dieses vermutlich zur Hydrolyse des TGT/ $tRNA$ -Komplexes führt (Romier et al., 1996c). Nach Silberfärbung (Kapitel 4.1.7.6) konnte man zusätzliche Banden bei etwa 66 kDa sowohl für den Ansatz TGT(w.t.)/ $tRNA^{Tyr}$ als auch TGT(S103A)/ $tRNA^{Tyr}$ identifizieren (Abb. 9). Die Banden bei etwa 66 kDa entsprechen einem 1:1-Komplex aus

TGT (42 kDa) und der monomeren $tRNA^{Tyr}$ (26 kDa) (Curnow & Garcia, 1994). Überraschenderweise konnte eine weitere Bande bei etwa 97 kDa (Kapitel 6.1.1) in der Mischung von TGT(S103A)/ $tRNA^{Tyr}$ gefunden werden, die ebenfalls für *Z. mobilis* TGT(D156A) beschrieben wurde (Romier et al., 1996c).

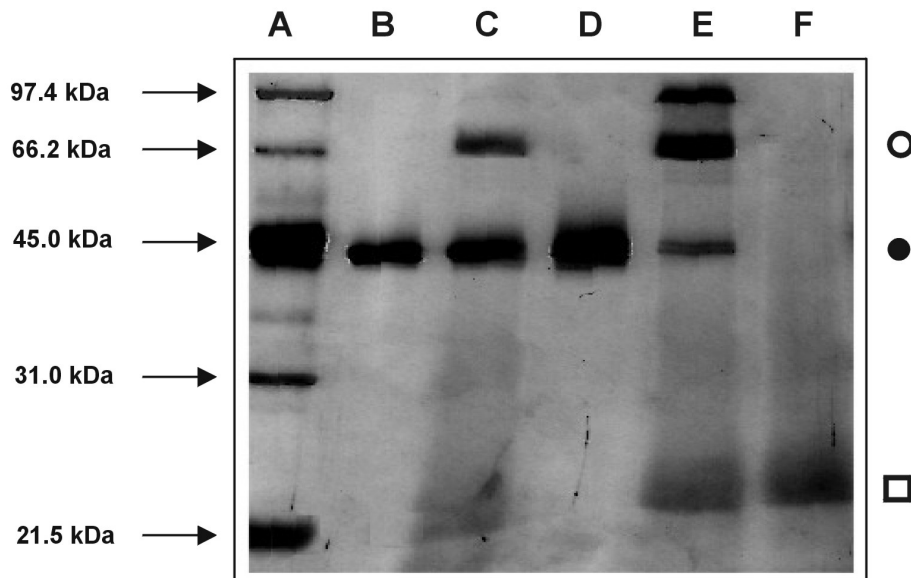


Abb. 9: Gelshift-Experiment mit TGT (w.t.) bzw. TGT(S103A) und $tRNA^{Tyr}$. Die gereinigte TGT (Wildtyp bzw. S103A-Mutante) wurde 1h bei 37°C mit einem 20-fachen Überschuß $tRNA^{Tyr}$ inkubiert und auf einem 12,5 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. (A) Größenstandard; (B) TGT (w.t.); (C) TGT (w.t.) + $tRNA^{Tyr}$; (D) TGT(S103A); (E) TGT(S103A) + $tRNA^{Tyr}$; (F) $tRNA^{Tyr}$. Die Protein- bzw. tRNA-Banden wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. [□, ungebundene tRNA; ●, ungebundenes Protein; ○, Gelshift]

5.1.1.3 Kristallographische Charakterisierung von TGT(S103A)

Zur strukturellen Charakterisierung wurde die TGT(S103A) unter den gleichen Bedingungen wie der Wildtyp kristallisiert (Kapitel 4.2.1) und die erhaltenen Kristalle mit dem Substrat $preQ_1$ „gesoakt“ (Kapitel 4.2.2). Die Strukturbestimmung des TGT(S103A)- $preQ_1$ -Komplexes erfolgte durch Röntgenbeugung unter kryogenen Bedingungen (Kapitel 4.2.3), wobei ein Datensatz mit einer Auflösung bis 2,0 Å erhalten wurde (Tab. 6).

Tab. 6: Datensammlung und Verfeinerung des Komplexes aus *Z. mobilis* TGT(S103A) und preQ₁ (3).

	TGT(S103A) · preQ ₁
Raumgruppe	C2
Zellkonstanten	
a (Å)	90,60
b (Å)	65,04
c (Å)	70,74
β (deg)	96,25
Auflösungsbereich (Å)	71-2,00
Zahl der unabhängigen Reflektionen	27018
Vollständigkeit der Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	97,4 (95,1)
R _{symm} ^a für alle Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	5,7 (24,3)
R _{free} ^b (%)	19,9
R-Faktor ^b (%)	16,1
Zahl der Wassermoleküle	
RMS-Abweichung, Winkel (deg)	
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	
PDB-Code (freigegeben: 1.3.2000)	1EFZ
^a $R_{\text{symm}} = \sum I - \langle I \rangle / \sum I$, wobei I die gemessene Intensität und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.	
^b Der R _{free} -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflektionen aus ~10% der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet.	

Zur kristallographischen Verfeinerung (Kapitel 4.2.3) wurde die Struktur der nativen apo-TGT (PDB-Code: **1PUD**) als Startmodell verwendet. Im ersten Verfeinerungszyklus wurde der Populationsparameter für die Besetzung der Atome von Tyr¹⁰⁶ auf 0 gesetzt, da der Hydroxyphenylring dieser Aminosäure bei Substratbindung eine signifikante Konformationsänderung vollzieht (Kapitel 2.4.2). Die Kristallstruktur von TGT(S103A)·preQ₁ weist nur geringe Änderungen auf verglichen mit der Struktur des TGT-Wildtyps (Abb. 10 b). Die Serin-103-Alanin Mutation und ein preQ₁-Molekül konnten eindeutig anhand der positiven |F_o-F_c|-Differenzelektronendichte in der Bindetasche der TGT(S103A) identifiziert werden (Abb. 10 a). Mit dem Programm O (Kapitel 4.2.3) erfolgte eine Konformationsänderung der Seitenkette von Tyr¹⁰⁶, der Austausch von Ser¹⁰³ gegen Alanin, sowie das Einpassen eines

preQ₁-Moleküls in die positive $|F_o - F_c|$ -Dichte. Das verfeinerte Strukturmodell von TGT(S103A)·preQ₁ zeigt eine identische Bindungsposition für das Substrat wie in der Struktur der Wildtyp-TGT (Abb. 10 b).

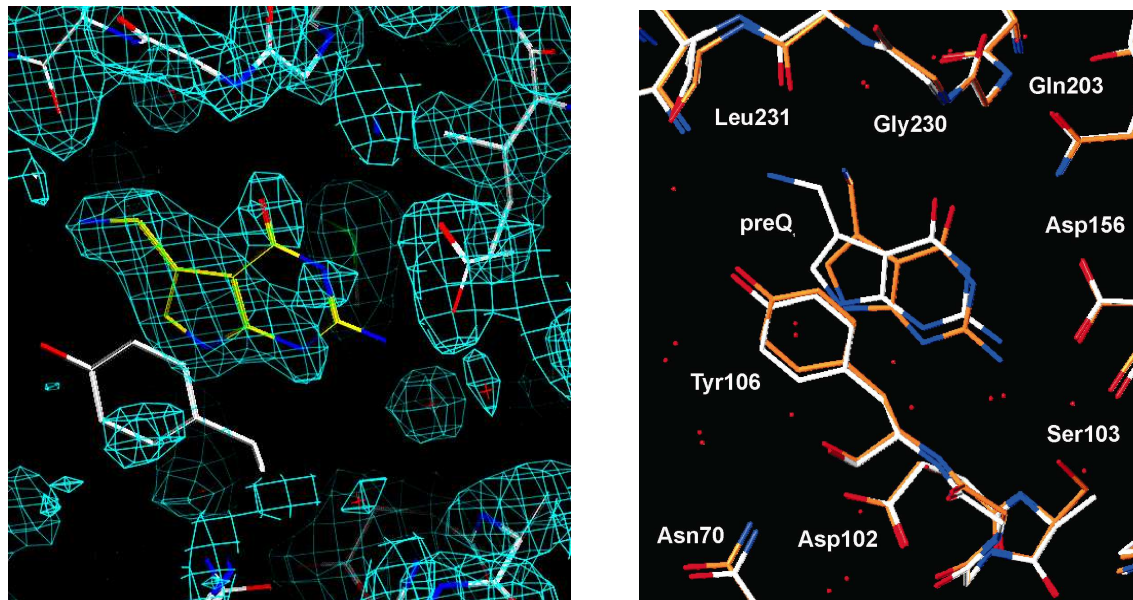


Abb. 10: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT(S103A) in Komplex mit preQ₁ (3) bei einer Auflösung von 2,0 Å. (a) Die $2F_o - F_c$ -Differenzelektronendichte (hellblau, konturiert auf 1σ) des verfeinerten Strukturmodells mit allen Atomen zeigt eine unterbrochene Dichte für die C2-NH₂-Gruppe von **3** und für die Hydroxyphenyl-Gruppe von Tyr¹⁰⁶. Ein zusätzliches Wassermolekül in Nachbarschaft der Ser103-Ala Mutation bildet eine H-Brücke zur C2-NH₂-Gruppe von **3** (links). (b) Die Überlagerung aller Hauptkettenatome („Cα-fit“) der Strukturen von TGT(w.t.)·**3** und TGT(S103A)·**3** läßt eine leichte Rotation des preQ₁-Moleküls in Richtung der Amidgruppe von Gly²³⁰ in der S103A-Mutanten erkennen (rechts).

Das preQ₁-Molekül ist interkaliert in einer amphiphilen Tasche zwischen den Seitenketten von Met²⁶⁰ auf der einen Seite, sowie Tyr¹⁰⁶ und Cys¹⁵⁸ auf der anderen Seite. Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen der TGT(S103A) und preQ₁ liegen über folgende Reste vor: Asp¹⁵⁶ und der 3-NH- (3,3 Å) bzw. 2-NH₂-Gruppe (2,6 Å), dem O4-Atom und dem Amid-Stickstoff von Gly²³⁰ (2,8 Å) bzw. der NH₂-Gruppe von Gln²⁰³ (3,7 Å). Die positive $|F_o - F_c|$ -Dichte von TGT(S103A)·preQ₁ deutete auf eine Position der exozyklischen Methylenamino-Gruppe in der Ringebene des preQ₁ hin und damit auf eine H-Brücke zu Leu²³¹ (2,8 Å). In der Struktur von TGT(w.t.)·preQ₁ ist die Methylenamino-Gruppe senkrecht zum 7-Deazaguanin-Ring von **3** angeordnet. Die 2-NH₂-Gruppe von preQ₁ bildet in TGT(S103A)·preQ₁ eine H-Brücke (2,8 Å) zu einem zusätzlichen Wassermolekül in Nachbarschaft zu der Serin-103-Alanin Mutation (Abb. 10 b). Dieses Wassermolekül ist nicht anwesend in der Struktur von TGT(w.t.)·preQ₁ und ersetzt daher formal die funktionelle

OH-Gruppe von Ser¹⁰³. Die 2F_o-F_c-Dichte des TGT(S103A)·preQ₁-Komplexes weist keine Dichte auf für die C2-NH₂-Gruppe von preQ₁ und eine nur fragmentarisch definierte Dichte (konturiert jeweils auf 1 σ) für die Hydroxyphenyl-Gruppe von Tyr¹⁰⁶ (Abb. 10 a). Eine Überlagerung aller Hauptkettenatome („Ca-fit“) von TGT(w.t.)·preQ₁ und TGT(S103A)·preQ₁ läßt eine leichte Rotation des preQ₁-Moleküls in Richtung der Amidgruppe von Gly²³⁰ erkennen (Abb. 10 b) (Grädler et al., 1999).

Die Koordinaten des TGT(S103A)·preQ₁-Komplexes wurden in der *Protein Data Bank* abgelegt (PDB-Code: **1EFZ**).

5.1.2 Charakterisierung der Y106W-Mutante der *Z. mobilis* TGT

Zur Entwicklung eines alternativen Enzymassays, der auf Fluoreszenzmessung beruht, wurde das Tyr¹⁰⁶ durch ortsspezifische Mutagenese gegen einen Tryptophan-Rest ausgetauscht. Der ursprüngliche Enzymassay (Curnow et al., 1993) der TGT nutzt die Eigenschaft des Enzyms, das Guanin-34 in der Antikodon-Schleife der tRNA gegen [8-³H]-Guanin auszutauschen und verfolgt somit die radioaktive Markierung der tRNA pro Zeiteinheit. Obwohl dieser Enzymassay zuverlässige K_t-Werte liefert, gibt es eine Reihe von Nachteilen beim Testen einer großen Anzahl von Verbindungen. Diese bestehen u.a. in hohen Anschaffungs- bzw. Entsorgungskosten des radioaktiven Materials, sowie einem hohen Zeitaufwand bei der *in vitro*-Transkription der tRNA^{Tyr}.

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine etablierte Methode zur Bestimmung der Bindungskonstanten von Protein-Ligand-Komplexen (Ward, 1985). Dabei wird häufig die Änderung der Fluoreszenzintensität am Maximum der Emissionswellenlänge des Proteins oder des Liganden in Abhängigkeit von der Konzentration verfolgt. Dazu kann z.B. die intrinsische Fluoreszenz der Tyrosin- bzw. Tryptophan-Reste des Proteins genutzt werden. Aufgrund ihrer hohen Quantenausbeute ist die Fluoreszenz-Emission von Tryptophan-Resten intensiver als die von Tyrosin-Resten, wobei die Intensität von der lokalen Umgebung des Restes abhängt. Die *Z. mobilis* TGT enthält einen Tyrosin-Rest (Tyr¹⁰⁶) im aktiven Zentrum, der bei Bindung eines Liganden (z.B. preQ₁) eine Konformationsänderung vollzieht (Abb. 4, Kapitel 2.4.2). Aufgrund der koplanaren Anordnung von preQ₁ liegen π - π -Wechselwirkungen zum Hydroxyphenyl-Ring von Tyr¹⁰⁶ vor. Dadurch könnte sich das Fluoreszenzverhalten von Tyr¹⁰⁶ ändern und so zu einer Änderung der Intensität im Bereich der maximalen Fluoreszenzemission führen („Quenching“, Kapitel 6.1.2). Die Konformationsänderung von Tyr¹⁰⁶ könnte daher als „Sensor“ genutzt werden, um das Eindringen von Liganden in die Bindetasche zu verfolgen.

Durch gezielte Mutation des Tyr¹⁰⁶ gegen einen Tryptophan-Rest sollte die Empfindlichkeit dieses „Sensors“ verstärkt werden.

5.1.2.1 Konstruktion und Reinigung von TGT(Y106W)

Die ortsspezifische Mutagenese erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR, Kapitel 4.1.4.9) unter Verwendung des Überexpressionsplasmids pETZM4 (Reuter & Ficner, 1995) der *Z. mobilis* TGT und den Oligonukleotid-Primern Y106W-s und Y106W-a (Tab. 4), die das Basenkodon für Trp¹⁰⁶ enthielten. Zunächst wurde eine analoge Strategie wie bei der Konstruktion von TGT(S103A) verfolgt (Kapitel 5.1.1.1), jedoch erbrachte die Transformation des PCR-Ansatzes nur zwei Klone, die laut Sequenzanalyse (Kapitel 4.1.5) beide nicht das gewünschte Plasmid enthielten.

Aufgrund der niedrigen Transformationseffizienz wurde eine alternative Strategie angewendet (Abb. 11), die zunächst zwei getrennte PCR-Amplifikationen (PCR-A bzw. PCR-B) von überlappenden DNA-Templaten im Bereich der Mutation umfaßte (Reuter et al., 1994). Die „inneren Primer“ (Y106W-s und Y106W-a), die das Basenkodon für Trp¹⁰⁶ enthielten, wurden jeweils mit einem „äußeren Primer“ (T7-s bzw. T7-a, Tab. 4) kombiniert und unter Verwendung von pETZM4 als Templat mittels PCR amplifiziert (Kapitel 4.1.4.9). Die PCR-Ansätze wurden auf einem Agarosegel (Kapitel 4.1.4.4) analysiert und der Erfolg der PCR aufgrund der Größe der amplifizierten Fragmente beurteilt (PCR-A: ~ 950 bp, PCR B: ~ 450 bp). Die PCR-Produkte wurden gereinigt (Kapitel 4.1.4.6) und in einem dritten PCR-Ansatz (PCR-C) mit den beiden „äußeren Primern“ (T7-s bzw. T7-a, Tab. 4) vereinigt. In diesem Schritt bildeten sich aus den Produkten von PCR-A und PCR-B einige Heteroduplex DNA-Moleküle, die verlängert und amplifiziert wurden (Abb. 11). Das Produkt von PCR-C (~ 1300 bp) enthielt das Basenkodon für Trp¹⁰⁶ und DNA-Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BamHI*. Nach ihrer Reinigung wurden die DNA-Fragmente aus dem PCR-C-Ansatz (Kapitel 4.1.4.6) mit *NcoI* und *BamHI* gespalten (Kapitel 4.1.4.3) und anschließend die Nukleasen nochmals durch einen Reinigungsschritt (Kapitel 4.1.4.6) entfernt. Das 1300 bp-Insert wurde dann in die *NcoI/BamHI*-Schnittstelle von pET9d (Tab. 3) kloniert. Dazu wurde pETZM4 mit *NcoI* und *BamHI* gespalten, der Vektor (~ 4700 bp) auf einem präparativen Agarosegel (Kapitel 4.1.4.4) vom *tgt*-Insert getrennt und die Vektor-DNA aus dem ausgeschnittenen Gelstück isoliert (Kapitel 4.1.4.5). Das *NcoI/BamHI*-Fragment von PCR-C wurde anschließend mit dem Vektor pET9d ligiert (Kapitel 4.1.4.7).

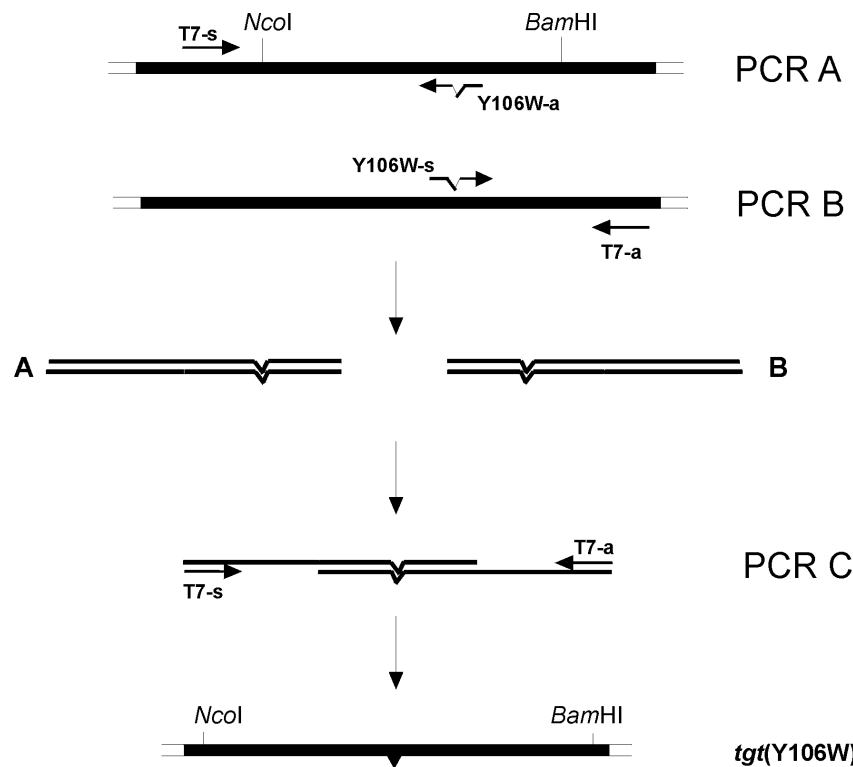


Abb. 11: Strategie für die ortsspezifische Mutagenese von *Tyr*¹⁰⁶ gegen einen Tryptophan-Rest. Zunächst wurden zwei getrennte PCR-Amplifikationen (PCR-A bzw. PCR-B) jeweils mit einem außerhalb des *tgt*-Gens bindenden Primer (T7-a bzw. T7-s) und einem der Primer (Y106W-a bzw. Y106-s), die den kodierenden Bereich für *Trp*¹⁰⁶ enthalten, kombiniert. Dabei wurden zwei Fragmente erhalten, die im Bereich der Mutation überlappen. In einer dritten PCR (PCR-C) wurden diese zusammen mit den beiden „äußeren“ Primern (T7-a bzw. T7-s) zum Auffüllen der noch fehlenden Basen kombiniert. Das resultierende DNA-Fragment *tgt*(Y106W) enthielt zwei Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI und *Nco*I), die eine korrekte Klonierung in den Vektor pET-9d erlaubten.

Der Ligationsansatz wurde in kompetente Zellen (*E. coli* XL2-blue, Tab. 2, Kapitel 4.1.3) transformiert (Kapitel 4.1.4.8) und die Transformanten auf Kanamycin-Agarplatten (Kapitel 4.1.2) selektioniert. Die Transformation brachte eine Vielzahl von Klonen hervor, von denen 10 selektiert und daraus die Plasmid-DNA präpariert wurde (Kapitel 4.1.4.1). Die Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle mit *Nco*I und *Bam*HI (1300 bp-Fragment) bzw. mit *Bam*HI und *Eco*RI (500 bp-Fragment) gespalten und danach auf einem Agarosegel analysiert. Von den 4 Klonen, die das gewünschte Insert (1300 bp) enthielten, wurde eine vollständige DNA-Sequenzanalyse (Kapitel 4.1.5) des Inserts angefertigt. Dabei enthielten die Inserts der Plasmide aller 4 untersuchten Klone die korrekte DNA-Sequenz mit der gewünschten *Tyr*-106-*Trp* Mutation. Das resultierende Plasmid pETZM4-Y106W wurde in kompetente

Zellen (*E. coli* BL21(DE3) pLysS, Tab. 2, Kapitel 4.1.3) transformiert (Kapitel 4.1.4.8) und nach Überexpression und Reinigung (Kapitel 4.1.7) die *Z. mobilis* TGT(Y106W) erhalten.

5.1.2.2 Biochemische Charakterisierung von TGT(Y106W)

Die TGT(Y106W) ließ sich analog zum Wildtyp exprimieren und reinigen und zeigte auf dem SDS-Polyacrylamidgel (Kapitel 4.1.7.5) eine Bande bei etwa 42 kDa. Die kinetischen Parameter von TGT(Y106W) wurden mit dem Enzymassay bestimmt (Kapitel 4.1.8.1), wobei ein 75 µl-Ansatz mit 20 µM tRNA^{Tyr}, variablen [8-³H]Guanin-Konzentrationen (0,2 - 20 µM) und 100 nM TGT(Y106W) eingesetzt wurde.

Der $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Wert für TGT(Y106W) lag bei $1,9 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und damit um den Faktor 15 niedriger als $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ für den Wildtyp ($28,9 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Die katalytische Wirksamkeit von TGT(Y106W) gegenüber dem Wildtyp wurde daher nur geringfügig durch die Tyrosin-106-Tryptophan Mutation beeinflusst (Tab. 7).

Tab. 7: Kinetische Parameter der *Z. mobilis* TGT (w.t.) und der Tyrosin-106-Tryptophan Mutante TGT(Y106W). Die katalytische Wirksamkeit des Enzyms ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) wurde durch Mutation von Tyr¹⁰⁶ im aktiven Zentrum leicht reduziert.

Kinetische Parameter	TGT(w.t.)	TGT(Y106W)
K_{m}	$0,38 \pm 0,12 \mu\text{M}$	$2,39 \pm 1,18 \mu\text{M}$
v_{max}	$48,8 \cdot 10^{-3} \pm 3,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}/\text{min}$	$28,5 \cdot 10^{-3} \pm 4,0 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}/\text{min}$
k_{cat}	$1,1 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2} \text{s}^{-1}$	$0,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2} \text{s}^{-1}$
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$	$28,9 \cdot 10^{-3} \pm 8,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1,9 \cdot 10^{-3} \pm 0,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$

5.1.2.3 Kristallographische Charakterisierung von TGT(Y106W)

Die Kristallisation von TGT(Y106W) erfolgte unter analogen Bedingungen wie die der Wildtyp-TGT (Kapitel 4.2.1) und durch „Soaking“ mit preQ₁ (**3**) wurde die substratgebundene Struktur bestimmt (Kapitel 4.2.3). Es konnte ein Datensatz der apo-Form von TGT(Y106W) sowie von TGT(Y106W)·**3** jeweils bei einer Auflösung von 1,8 Å erhalten werden. Die kristallographische Verfeinerung (Kapitel 4.2.3) erfolgte nach der gleichen Strategie (Tab. 8) wie bei TGT(S103A)·**3** (Kapitel 5.1.1.2).

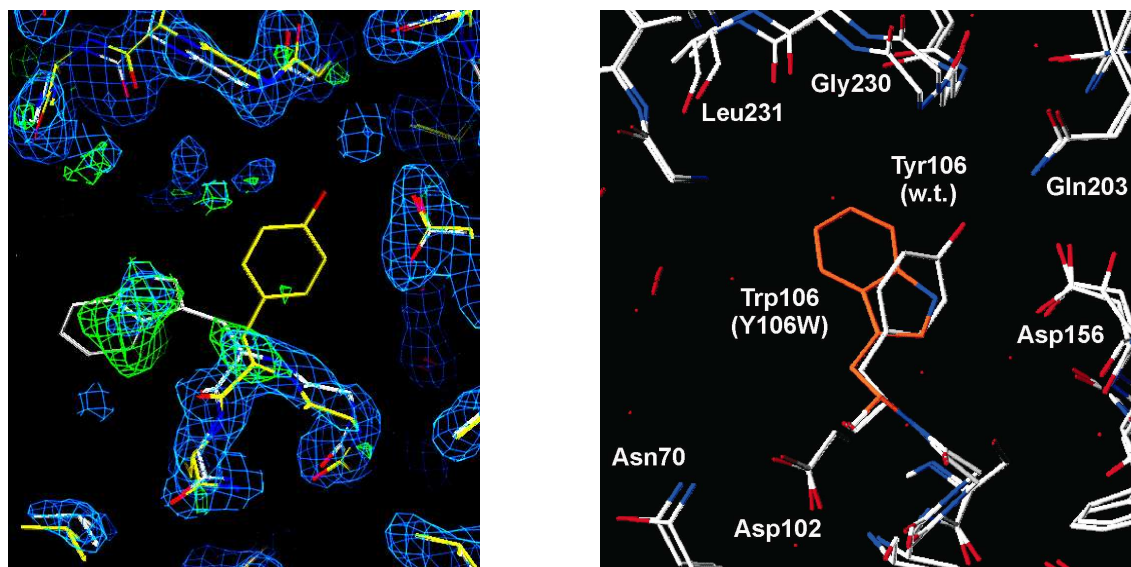


Abb. 12: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT(Y106W) bei einer Auflösung von 1,8 Å. (a) Die Form der positiven $|F_o - F_c|$ -Dichte nach der ersten Verfeinerung (Populationsparameter für Trp¹⁰⁶ auf 0 gesetzt) deutete auf alternative Bindungspositionen für den Indolrest von Trp¹⁰⁶ hin (links). Eine Orientierung der Seitenkette von Trp¹⁰⁶ zur Carboxylatgruppe von Asp¹⁵⁶, wie sie in der apo-Form der Wildtyp-TGT (gelb) gefunden wird, war jedoch nicht mit der $|F_o - F_c|$ -Dichte vereinbar. (b) Der minimale Abstand, den die NH-Gruppe des Indol-Rings von Trp¹⁰⁶ zu Asp¹⁵⁶ ausbilden kann, beträgt 3,1 Å in TGT(Y106W) (orange). In der Struktur der Wildtyp-TGT (weiß) liegt eine H-Brücke zwischen Tyr¹⁰⁶ und Asp¹⁵⁶ (3,0 Å) bzw. Gln²⁰³ (2,9 Å) vor (rechts).

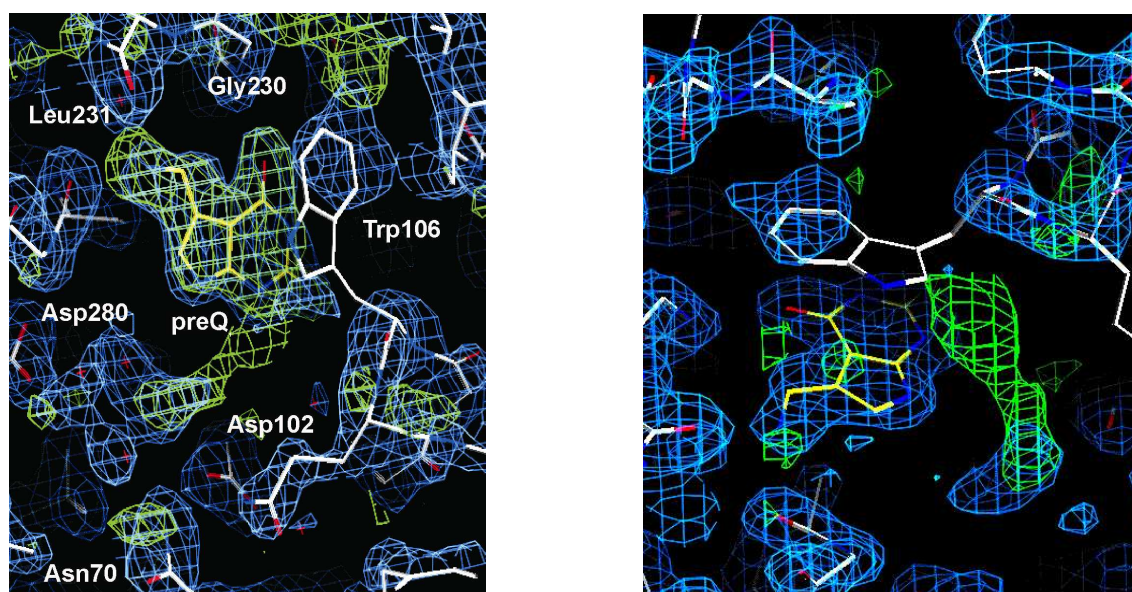


Abb. 13: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT(Y106W) in Komplex mit preQ₁ bei einer Auflösung von 1,8 Å. (a) Die Form der positiven $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte nach der ersten Verfeinerung deutete auf mehrere alternative Bindungspositionen für den Indolrest von Trp¹⁰⁶ hin. Die Position eines preQ₁-Moleküls (gelb) konnte eindeutig in der $|F_o - F_c|$ -Dichte identifiziert werden (links). (b) Die $2F_o - F_c$ -Dichte (hellblau, konturiert auf 1 σ) des verfeinerten Strukturmodells mit allen Atomen zeigt einen unterbrochenen Bereich für die Seitenkette von Trp¹⁰⁶ (rechts).

Die Kristallstruktur der apo-Form von TGT(Y106W) zeigte nach dem ersten Verfeinerungszyklus (Populationsparameter der Trp¹⁰⁶-Atome auf 0 gesetzt) eine positive $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte im Bereich der Tyrosin-106-Tryptophan Mutation, die jedoch von ihrer Form her nicht zu einer einzigen Vorzugskonformation von Trp¹⁰⁶ paßte (Abb. 12). Die Seitenkette von Trp¹⁰⁶ wurde manuell in den größten Bereich dieser Elektronendichte modelliert und die Atome in die weiteren Verfeinerungszyklen übernommen. Die $2F_o - F_c$ -Dichte der verfeinerten Struktur zeigt unterbrochene Bereiche für einen Teil des aromatischen Ringes von Trp¹⁰⁶, was auf das Vorliegen alternativer Konformationen hindeutet. Eine mögliche Orientierung von Trp¹⁰⁶ zu Asp¹⁵⁶, wie für Tyr¹⁰⁶ in der Struktur der Wildtyp-TGT beobachtet (Abb. 4), kann jedoch auf Grundlage der vorliegenden Röntgendaten ausgeschlossen werden (Abb. 12 b).

Die positive $|F_o - F_c|$ -Dichte von TGT(Y106W)·**3** zeigte nach dem ersten Verfeinerungszyklus eindeutig die Anwesenheit eines preQ_I-Moleküls. Im verfeinerten Strukturmodell von TGT(Y106W)·**3** kann eine analoge Bindungsposition des Liganden wie in den entsprechenden Komplexen der TGT (w.t.) und TGT(S103A) gefunden werden (Abb. 13 a). Die $2F_o - F_c$ -Dichte zeigt jedoch, wie in der apo-Form von TGT(Y106W) bereits beobachtet, unterbrochene Bereiche für die Seitenkette von Trp¹⁰⁶ (Abb. 13 b).

Tab. 8: Datensammlung und Verfeinerung der apo-Form von *Z. mobilis* TGT(Y106W) und des Komplexes aus *Z. mobilis* TGT(Y106W) und preQ₁.

	TGT(Y106W)	TGT(Y106W)· preQ ₁
Raumgruppe	C2	C2
Zellkonstanten		
a (Å)	89,78	90,47
b (Å)	64,74	65,02
c (Å)	71,08	70,57
β (deg)	96,51	96,35
Auflösungsbereich (Å)	10-1,8	10-1,8
Zahl der unabhängigen Reflektionen	35.698	35.834
Vollständigkeit der Daten	94,9 (91,7)	94,9 (91,5)
(%, hoher Auflösungsbereich)		
R _{symm} ^a für alle Daten	6,2 (32,7)	5,2 (37,9)
(%, hoher Auflösungsbereich)		
R _{free} ^b (%)	20,1	21,3
R-Faktor ^b (%)	15,7	18,3
Zahl der Wassermoleküle	427	427
RMS-Abweichung, Winkel (deg)	1,431	1,482
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,006	0,007

^a $R_{\text{symm}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, wobei I die gemessene Intensität und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.

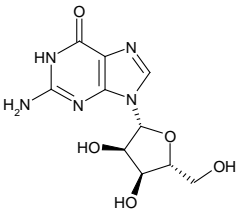
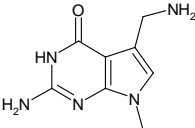
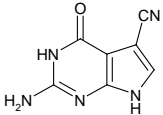
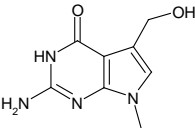
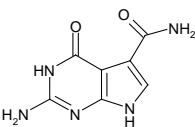
^b Der R_{free} -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflektionen aus ~10% der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet.

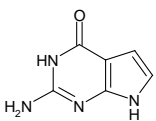
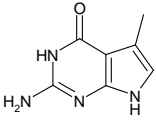
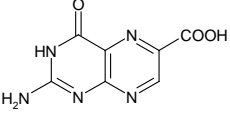
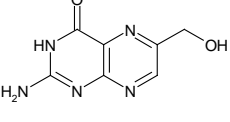
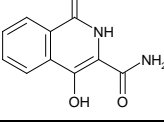
5.2 Strukturaufklärung der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit Substrat-Analoga

Zur weiteren Charakterisierung der Substratbindungsstelle wurden substratanaloge Guanin-Derivate (Hoops et al., 1995b) und Pterine in Kristalle der *Z. mobilis* TGT „gesoakt“ (Kapitel 4.2.2) und die Struktur der Komplexe bestimmt (Kapitel 4.2.3). Die Guanin-Derivate wurden freundlicherweise von Dr. George Garcia (Univ. of Michigan, College of Pharmacy, USA) zur Verfügung gestellt, die Pterine wurden von Schircks Laboratories (Jona, Schweiz) bezogen.

Von den neun getesteten Verbindungen konnte jeweils für zwei Verbindungen (7-Methyl-preQ₁, **18** und preQ₀, **2**) eine interpretierbare positive $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte im Bereich der potentiellen Substrat-Bindungsstelle nach der kristallographischen Verfeinerung erhalten werden (Tab. 9). Für beide Verbindungen wurden K_i -Werte im unteren mikromolaren Bereich beschrieben, während die Affinitäten der übrigen Verbindungen, soweit bekannt, um bis zu vier Größenordnungen niedriger sind (Hoops et al., 1995b).

Tab. 9: Soaking-Versuche der *Z. mobilis* TGT mit Guanin- und Pterin-Derivaten.

#	Verbindung	Struktur	K_i [μ M]	Auflösung	Dichte
17	D-Guanosin		— ^a	2,1 Å	— ^d
18	7-Methyl-preQ ₁		0,5 ^b	1,9 Å	☼ ^d
2	preQ ₀		0,8	2,2 Å	☼ ^d
19	2-Amino-5-(hydroxymethyl)-7-methyl-pyrrolo-[2,3-d]-pyrimidin-4-(3H)-on		30	1,95 Å	— ^d
10	2-Amino-7H-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidin-4-(3H)-on-5-carboxamid		88	1,85 Å	— ^d

11	7-Deazaguanin		210	2,3 Å	— ^d
12	2-Amino-5-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on		506	2,0 Å	— ^d
20	Pterin-6-carbonsäure		— ^c	2,1 Å	— ^d
21	6-Hydroxymethylpterin		— ^c	2,3 Å	— ^d
22	4-Hydroxy-1(2H)-isochinolon-3-carbonsäureamid		— ^a	2,4 Å	— ^c

^a K_i-Wert nicht bekannt.
^b K_i-Werte aus (Hoops et al., 1995b).
^c K_i-Wert von Pterin nur für eukaryotische TGT (90 nM) bekannt (Kapitel 3.1.2).
^d Interpretierbare |F_o-F_c|-Differenzelektronendichte für das „gesoakte“ Molekül nach Verfeinerung des Datensatzes (—, nicht interpretierbar; ☼, interpretierbar)

Es konnte jeweils ein Datensatz der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit 7-Methyl-preQ₁ (Auflösung bis 1,9 Å) und preQ₀ (Auflösung bis 2,2 Å) erhalten werden (Tab. 10). Die kristallographische Verfeinerung (Kapitel 4.2.3) erfolgte unter Verwendung der apo-TGT Struktur (PDB-Code: **1PUD**) als Startmodell (Kapitel 5.1.1.2). Nach den ersten Verfeinerungszyklen (Populationsparameter der Tyr¹⁰⁶-Atome auf 0 gesetzt) zeigten beide Komplexe jeweils eine positive |F_o-F_c|-Differenzelektronendichte im Bereich der potentiellen Substrat-Bindungsstelle. Die Form dieser Dichte entsprach einem Guanin-Derivat in einer analogen Orientierung, wie sie für preQ₁ in TGT-preQ₁ beschrieben wurde (Romier et al., 1996b).

Das 7-Methyl-preQ₁ ist über H-Brücken zwischen der 3-NH- (3,7 Å) bzw. 2-NH₂-Gruppe (3,2 Å) und Asp¹⁵⁶, dem O4-Atom und dem Amid-Stickstoff von Gly²³⁰ (2,7 Å) bzw. der NH₂-Gruppe von Gln²⁰³ (3,3 Å) spezifisch gebunden (Abb. 14). Ein Dihedralwinkel von etwa 90° für das Strukturelement C6-C5-CH₂-NH₂ des 7-Methyl-preQ₁ ist gut mit der positiven |F_o-F_c|-Dichte an der entsprechenden Position zu Leu²³¹ (2,9 Å) vereinbar.

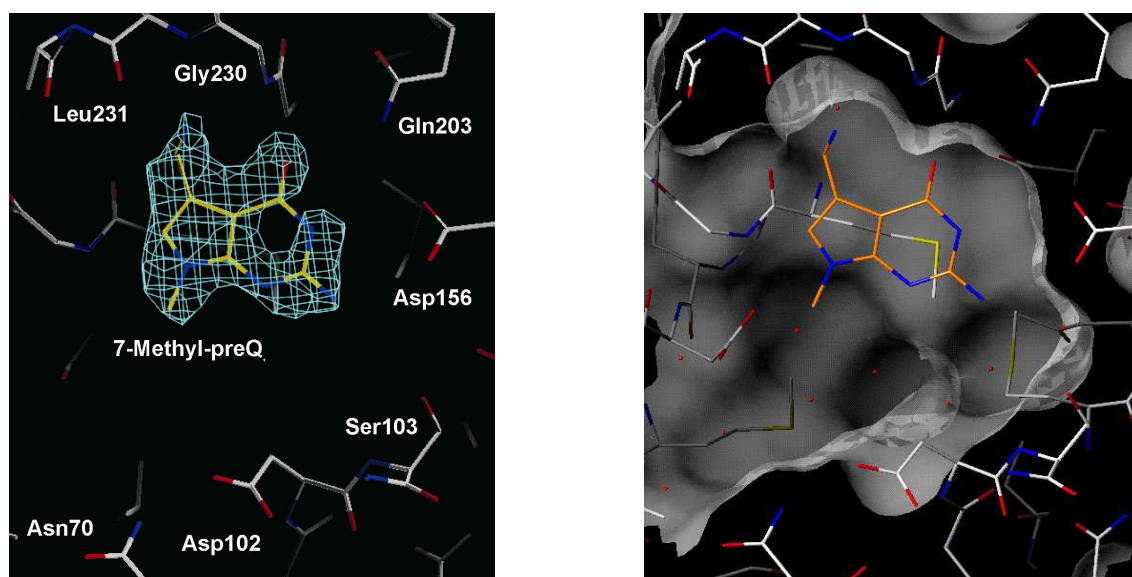


Abb. 14: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit 7-Methyl-preQ₁ (18) bei einer Auflösung von 1,9 Å. (a) Die 2F_o-F_c-Dichte (hellblau, konturiert auf 1 σ) zeigt einen unterbrochenen Bereich zwischen der 4-Carbonylgruppe und der 3-NH-Gruppe (links). Wasserstoffbrücken zwischen **18** und der TGT liegen zwischen folgenden Resten vor: der 3-NH- (3,7 Å) bzw. 2-NH₂-Gruppe (3,2 Å) und Asp¹⁵⁶, dem O4-Atom und dem Amid-Stickstoff von Gly²³⁰ (2,7 Å) bzw. der NH₂-Gruppe von Gln²⁰³ (3,3 Å) sowie zwischen der C5-CH₂-NH₂-Gruppe und Leu²³¹ (2,9 Å). (b) Darstellung der wasserzugänglichen Connolly-Oberfläche (Kapitel 5.4.1) im Bereich der Bindetasche (rechts).

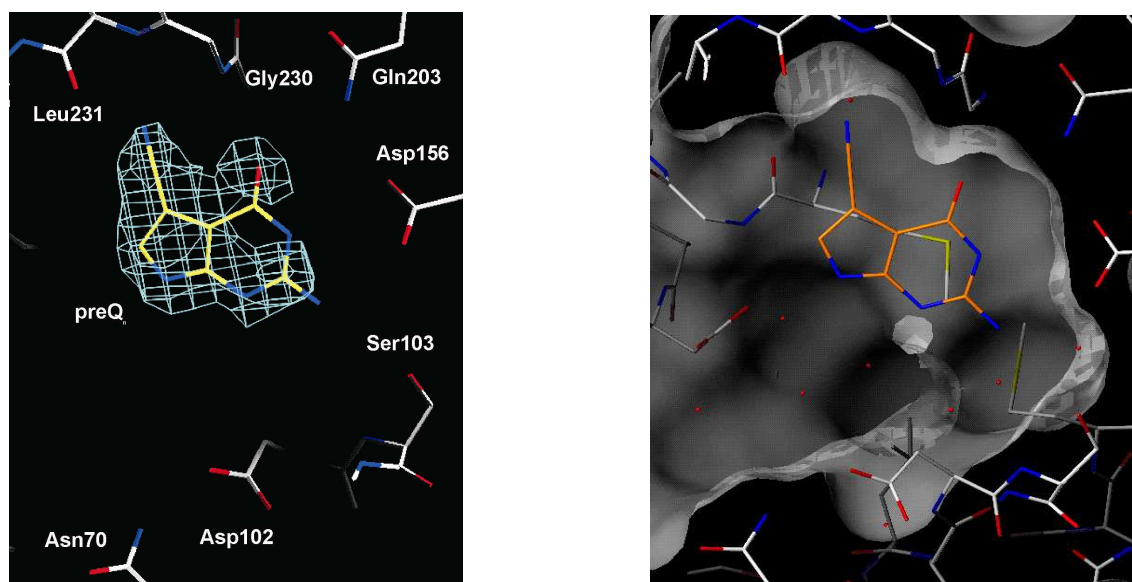


Abb. 15: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit preQ₀ (2) bei einer Auflösung von 2,2 Å. Die 2F_o-F_c-Dichte (hellblau, konturiert auf 1 σ) zeigt einen unterbrochenen Bereich für die 3-NH- und 2-NH₂-Gruppen sowie für C4 von **2**. Wasserstoffbrücken zwischen **2** und der TGT liegen zwischen folgenden Resten vor: der 3-NH- (3,4 Å) bzw. 2-NH₂-Gruppe (3,0 Å) und Asp¹⁵⁶, dem O4-Atom und dem Amid-Stickstoff von Gly²³⁰ (3,4 Å) bzw. der NH₂-Gruppe von Gln²⁰³ (3,4 Å) sowie zwischen der CN-Gruppe und dem Amid-NH von Gly²³⁰ (3,1 Å) bzw. Leu²³¹ (3,1 Å). (b) Darstellung der wasserzugänglichen Connolly-Oberfläche (Kapitel 5.4.1) im Bereich der Bindetasche (rechts).

Diese Konformation der exozyklischen $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ -Gruppe wird auch in der Struktur von $\text{TGT(w.t.)}\cdot\text{preQ}_1$ beobachtet. Dagegen zeigt der $\text{TGT(S103A)}\cdot\text{preQ}_1$ -Komplex eine um etwa 90° gedrehte Orientierung der Methylenamino-Gruppe und dadurch eine H-Brücke zu Leu^{231} (2,9 Å) (Abb. 10).

Im verfeinerten Modell des $\text{TGT}\cdot\text{preQ}_0$ -Komplexes bei 2,2 Å Auflösung ist die lineare Nitril-Gruppe in Richtung der Carbonylgruppe von Leu^{231} (2,5 Å) orientiert (Abb. 15). Schwache Wasserstoffbrücken liegen zwischen dem Nitril-Stickstoff und dem Amid-NH von Gly^{230} (3,1 Å) bzw. von Leu^{231} (3,1 Å) vor. In der $2\text{F}_o\text{-F}_c$ -Dichte ist jedoch ein unterbrochener Bereich für die 3-NH- bzw. 2-NH₂-Gruppe sowie für das C4-Atom von preQ_0 zu erkennen (Abb. 15).

Tab. 10: Datensammlung und Verfeinerung der Komplexe von *Z. mobilis* TGT und den Substrat-Analoga 7-Methyl- preQ_1 (18) und 7-Cyano-7-deazaguanin (preQ_0 , 2).

	TGT·18	TGT· preQ_0
Raumgruppe	C2	C2
Zellkonstanten		
a (Å)	90,65	91,11
b (Å)	64,90	65,12
c (Å)	71,43	70,28
β (deg)	96,11	96,36
Auflösungsbereich (Å)	10-1,9	10-2,2
Zahl der unabhängigen Reflektionen	31.656	20.898
Vollständigkeit der Daten	98,4 (96,3)	100 (100)
(%, hoher Auflösungsbereich)		
R_{symm}^a für alle Daten	4,8 (26,6)	7,5 (23,3)
(%, hoher Auflösungsbereich)		
R_{free}^b (%)	21,6	22,1
R-Faktor ^b (%)	17,6	16,6
Zahl der Wassermoleküle	445	415
RMS-Abweichung, Winkel (deg)	1,407	1,354
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,006	0,006
^a $R_{\text{symm}} = \Sigma I - \langle I \rangle / \Sigma I$, wobei I die gemessene Intensität und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.		
^b Der R_{free} -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflektionen aus ~10% der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet.		

5.3 Erster Design-Zyklus: Suche von Leitstrukturen mit LUDI

Die Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT war der Ausgangspunkt zum *de novo*-Design von neuen Liganden, die synthetisch einfacher zugänglich sein sollten als die zuvor untersuchten Purin-Derivate (Hoops et al., 1995b).

5.3.1 Datenbanksuche mit LUDI

Die Struktur der TGT in Komplex mit dem Substrat preQ₁ (Romier et al., 1996b) wurde zur Datenbanksuche nach neuen Leitstrukturen mit dem Computer-Programm LUDI (Böhm, 1992a) verwendet (Kapitel 4.5.1). Dazu wurde ein spezielles Interface zwischen SYBYL und LUDI verwendet und die Struktur zunächst in folgenden Schritten aufbereitet:

- (1) Entfernen aller HETATM-Einträge der PDB-Struktur (Atome wie: Wasser, Zink und preQ₁) aus dem Strukturmodell von TGT

```
Q1.
```
- (2) Anfügen aller H-Atome in Standardgeometrien an die Haupt- und Seitenketten des Proteins, gefolgt von einer Kraftfeld-Minimierung mit dem TRIPOS-Kraftfeld in SYBYL (Kapitel 4.4).
- (3) Definition eines Zentrums und eines Radius in der Bindetasche, so daß Wechselwirkungszentren für diejenigen Aminosäuren generiert wurden, die an der Substratbindung beteiligt sind. Als Zentrum wurde das C7a-Atom von preQ₁ (Abb. 16) und ein Radius von 6 Å gewählt.
- (4) Eingabe bestimmter Parameter für LUDI, z.B. Anzahl der Wechselwirkungszentren, minimaler Scoringwert, Zahl der zu berücksichtigenden Hits.

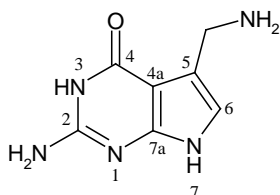


Abb. 16: Numerierung von preQ₁. Das C7a-Atom wurde als Zentrum für die Generierung der Wechselwirkungszentren von LUDI im Radius von 6 Å im Bereich der Bindetasche gewählt.

Zur optimalen Auswahl der Eingabe-Parameter (Punkt 4) wurde die Suche zunächst mit einer kleinen Datenbank bekannter Substrate (z.B. Guanin, **1**; preQ_i, **3**; 7-Methyl-preQ_i, **18**) der TGT getestet. Die Strukturen dieser Moleküle wurden in SYBYL (SYBYL, 1999) aufgebaut, mit dem TRIPOS-Kraftfeld minimiert (Kapitel 4.4) und im PDB-Format ausgeschrieben. Anschließend wurden diese Strukturen in einer Datenbank abgelegt und mit GENFRA (Kapitel 4.5.1) in das LUDI-spezifische Format konvertiert. Als Referenz wurde die von LUDI vorgeschlagene Plazierung für 7-Methyl-preQ_i (**18**) mit der experimentellen Struktur von TGT-**18** (Abb. 14, Kapitel 5.2) verglichen und die Parameter so eingestellt, daß eine möglichst gute Übereinstimmung (RMS-Wert = 1,27 Å) zwischen gedockter und experimenteller Struktur erreicht wurde (Abb. 17 a). Für die gedockte Position von 7-Methyl-preQ_i berechnete LUDI einen Scoringwert von 700 (Abb. 17 b), der experimentelle K_i dieser Verbindung gegenüber der *E. coli* TGT wurde mit 0,5 µM angegeben (Hoops et al., 1995b).

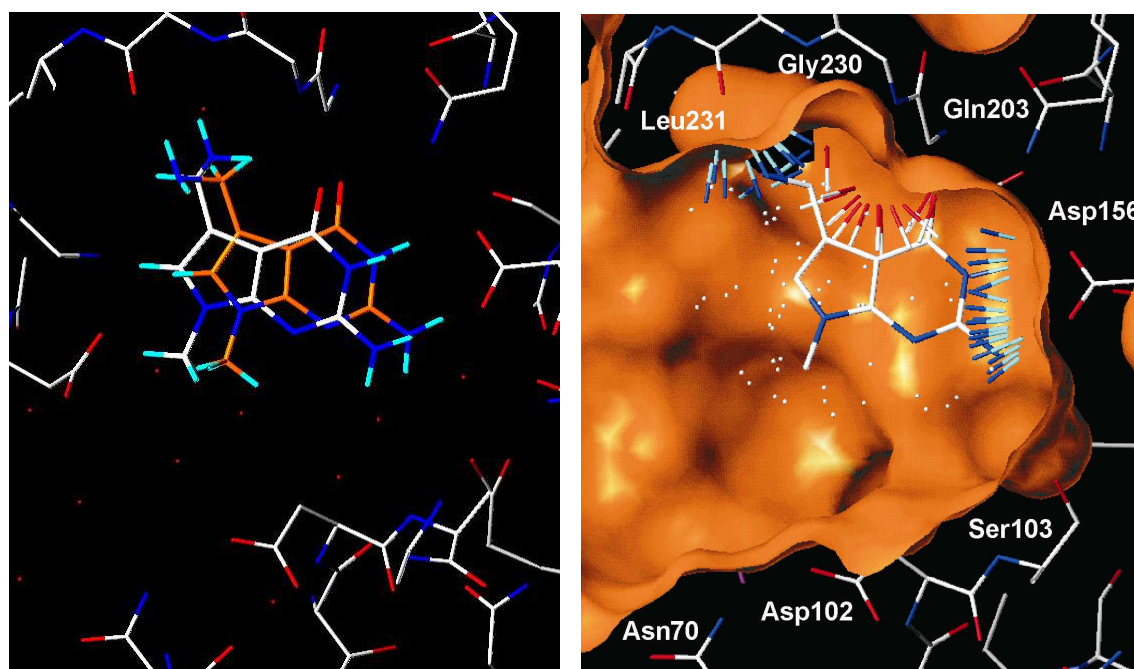


Abb. 17: Vergleich der experimentellen Kristallstruktur von 7-Methyl-preQ_i (18**) in Komplex mit TGT mit der von LUDI gefundenen Position.** (a) Vergleich der experimentellen Struktur von **18** in Komplex mit der TGT und der Docking-Lösung von LUDI (orange) (links). Der RMS-Wert bezogen auf die Positionen von **18** beträgt 1,27 Å. (b) Für diese Position berechnete LUDI einen Scoringwert von 700. Die experimentelle Bindungsaffinität von 7-Methyl-preQ_i gegenüber der *E. coli* TGT wurde mit 0,5 µM (pK_i = 6,3) angegeben (Kapitel 3.1.1) (rechts).

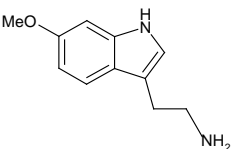
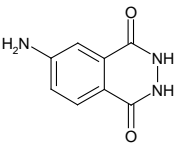
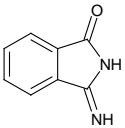
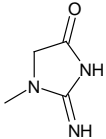
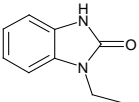
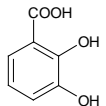
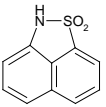
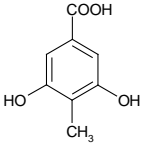
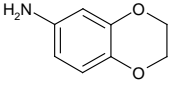
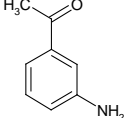
Folgende Eingabe-Parameter erwiesen sich als geeignet für die Datenbanksuche mit LUDI (Tab. 11):

Tab. 11.: Verwendete Eingabe-Parameter für die Datenbanksuche mit LUDI.

Parameter	Wert	Kommentar
CUTOFF	6,00	Cutoff Radius (Å)
XSITE	17,114	x-Position des Zentrums
YSITE	17,123	y-Position des Zentrums
ZSITE	21,737	z-Position des Zentrums
RMSMAX	0,55	Maximale RMS-Abweichung des Hits
PRESEL	2,00	Zahl der Wechselwirkungszentren, die bei der Plazierung kombiniert werden
VDWCUT	3,50	Van-der-Waals Cutoff
ES CUT	2,50	Minimale Distanz zwischen polaren H-Atomen des Proteins und des Liganden
ANGMAX	14,00	Maximale Winkelabweichung zu einem Link-Fragment (nur für Link-Modus)
IOUT	0	Umfang der Output-Dateien, die LUDI ausschreibt
IELEC	1	Elektrostatische Abstoßung wird überprüft
IDENSL	25	Zahl der lipophilen Wechselwirkungszentren je Proteinatorn
IDENSP	25	Zahl der polaren Wechselwirkungszentren je Proteinatorn
IFLAGV	1	Keine Unterscheidung zwischen aromatischen und aliphatischen Atomtypen
ILINK	0	Link-Modus ausgeschaltet
IANALG	0	„Active-analog“ Modus ausgeschaltet
IBIFUR	1	Vermeidung von Bifurkationen bei Wasserstoffbrücken-Bindungen
ICONMI	10	Minimaler Kontaktbereich (%) zwischen Ligand und Protein
WLINK	1,00	Gewichtungsfaktor für Link-Modus
WLIPO	1,00	Gewichtungsfaktor für lipophilen Wechselwirkungszentren
WHBOND	1,00	Gewichtungsfaktor für polare Wechselwirkungszentren
NFITS	5000	Maximale Zahl von RMS-Fits pro Ligand
IMINSC	280	Minimaler Scoringwert zur Auswahl eines Hits
NHITS	500	Anzahl berücksichtigter Hits
IBINRD	0	Liganden sind in der Datenbank im PDB-Format abgelegt
IBURID	0	Keine Überprüfung von vergrabenen polaren Gruppen

Die Suche wurde in dem *Available Chemical Directory* (MDL, 1997) durchgeführt, einer Datenbank mit über 180.000 Verbindungen (Stand: Juli 1998), die kommerziell erhältlich bzw. deren Synthesen in der Literatur beschrieben sind. Die Datenbanksuche dauerte etwa 2 Tage und ergab zahlreiche Vorschläge, die mit der in LUDI implementierten Scoring-Funktion (Kapitel 4.6.1) bewertet wurden. Die Vorschläge wurden in einer Rangfolge ausgeschrieben, wobei 162 Hits einen Scoringwert > 280 erreichten. Die 10 Hits mit den höchsten Scoringwerten (560 - 451) sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tab. 12: Ergebnisse der LUDI-Suche in dem *Available Chemical Directory* (ACD). Aus über 180.000 Verbindungen wurden 162 Hits von LUDI auf die Wechselwirkungszentren mit einem Scoringwert > 280 plziert. Die 10 Hits mit den höchsten Scoringwerten (LUDI-Score: 560 - 451) sind hier aufgeführt. Alle Verbindungen sind kommerziell erhältlich.

#	Struktur	LUDI-Score	Vermerk
23		560	Sigma # M-7384
24		542	Fluka # 09254
25		541	Aldrich # 22,445-6
26		476	Fluka # 27910
27		471	Aldrich # 19,401-8
28		471	Sigma # D-5395
29		470	Aldrich # 22,802-8
30		463	Aldrich # 31,848-5
31		453	Aldrich # 19,323-2
32		451	Aldrich # 13,935-1

Die gedockten Positionen der beiden LUDI-Hits mit den höchsten Scoringwerten, 6-Methoxytryptamin (**23**) und 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**), relativ zu den Wechselwirkungszentren von LUDI sind in Abb. 18 dargestellt. In beiden Fällen liegen die aromatischen Ringe der Verbindungen in der gleichen Ebene und überdecken einen Bereich, für den LUDI lipophile Wechselwirkungszentren generiert hat. Beiden Hits gemeinsam ist auch eine H-Brücke zwischen ihrer NH_2 -Gruppe und dem Carbonylsauerstoff von Leu²³¹ (**23**: 2,6 Å; **24**: 3,0 Å). Die 2-Carbonylgruppe von **24** bildet eine H-Brücke zu dem Amid-NH von Gly²³⁰ (2,9 Å) sowie der NH_2 -Gruppe von Gln²⁰³ (2,9 Å), außerdem befinden sich die NH -Gruppen des Hydrazins in günstiger H-Brücken-Position zu Asp¹⁵⁶ (2,7 Å und 3,2 Å). Das 6-Methoxytryptamin bildet in diesem Bereich nur eine H-Brücke zwischen dem Indol-NH und einem O-Atom von Asp¹⁵⁶ (3,0 Å). Ein repulsiver Kontakt liegt zwischen der C7H-Gruppe von **23** und einem Carboxylatsauerstoff von Asp¹⁵⁶ vor (3,4 Å). Die Methoxygruppe von **23** befindet sich in H-Brücken-Distanz zu dem Amid-NH (3,5 Å) bzw. zur OH-Gruppe (3,5 Å) von Ser¹⁰³.

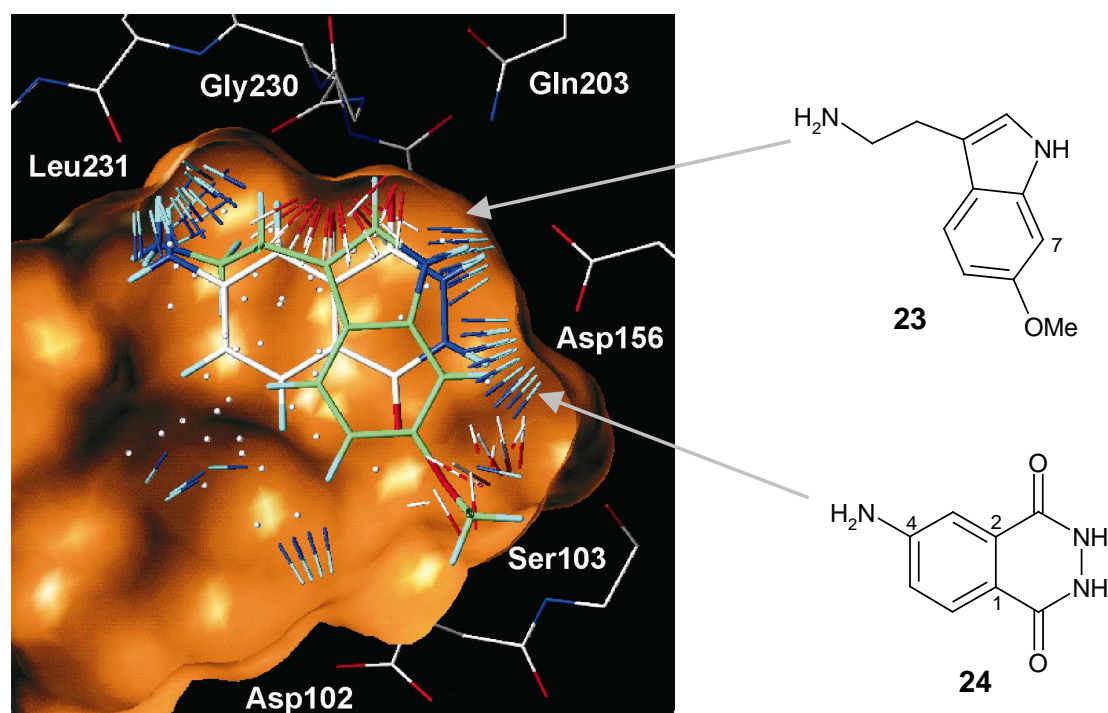


Abb. 18: Platzierung der beiden Datenbank-Hits mit den höchsten Scoringwerten, 6-Methoxytryptamin (**23**, grün, LUDI-Score = 560) und 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**, weiß, LUDI-Score = 542), auf den Wechselwirkungszentren (blaue Vektoren: H-Donor, rot-weiße Vektoren: H-Akzeptor, weiße Kugeln: lipophile Zentren) von LUDI.

5.3.2 Kinetische Charakterisierung der Vorschläge

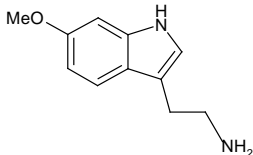
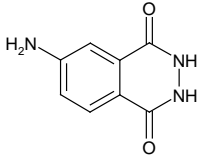
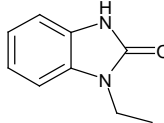
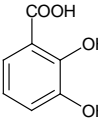
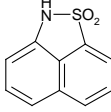
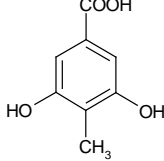
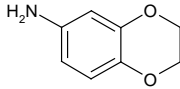
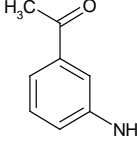
5.3.2.1 Test auf Inhibition

Während eines Aufenthalts im Labor von Dr. George Garcia (College of Pharmacy, Univ. of Michigan, USA) wurden acht Verbindungen von den ersten zehn LUDI-Hits im Enzymassay (Kapitel 4.1.8.2) auf eine mögliche Inhibierung der *Z. mobilis* TGT getestet. Die Verbindungen wurden in DMSO gelöst und für den Assay 1:10 in dem Reaktionspuffer (pH 7,3) verdünnt. Dabei präzipitierte das 3-Iminoisoindolinon (**25**) beim Verdünnen in der wässrigen Lösung, was vielleicht auf eine Hydrolyse des Imins zurückzuführen ist. Diese Verbindung wurde daher nicht weiter untersucht.

In einer ersten Versuchsreihe wurden gesättigte tRNA^{Tyr}-Konzentrationen (20 μ M) und eine konstante 8-[³H]-Guanin-Konzentration im Bereich von K_m (0,4 μ M) eingesetzt, da unter diesen Bedingungen eine deutliche Änderung der Anfangsgeschwindigkeit (v_i) im Falle einer kompetitiven Inhibition zu erwarten war. Die acht Verbindungen zeigten jedoch keine signifikante Änderung von v_i in einem Konzentrationsbereich bis zu 500 μ M.

Auf Anregung von Dr. George Garcia wurden die Bedingungen für den Enzymassay durch einen zusätzlichen Präinkubationsschritt modifiziert. Dabei wurde zunächst die *Z. mobilis* TGT mit der jeweiligen Verbindung in einer höheren Konzentration (bis zu 5 mM) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde dann durch Zugabe der Substrate (20 μ M tRNA^{Tyr} und 0,5 μ M 8-[³H]-Guanin) gestartet (Kapitel 4.1.8.2). Für 1,8-Naphthalinsultam (**29**) und 2,3-Dihydroxybenzoesäure (**28**) konnten schwache Inhibitionseffekte gemessen werden (K_i = 1000 μ M bzw. 3000 μ M), dagegen zeigte 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) eine deutliche Inhibierung (K_i = $8,3 \pm 0,4$ μ M) im mikromolaren Bereich (Tab. 13). Diese Verbindung wurde daher in weiteren Enzymassays genauer charakterisiert (Kapitel 5.3.2.2).

Tab. 13: Verbindungen aus der LUDI-Suche, die mit dem Enzymassay untersucht wurden.

#	Verbindung	Struktur	LUDI-Score	K _i [μM]
23	6-Methoxytryptamin		560	> 5000 ^a
24	4-Aminophthalsäure-hydrazid		542	8,3 ± 0,4
27	1-Ethylbenzimidazolin-2-on		471	> 5000
28	2,3-Dihydroxybenzoesäure		471	3000
29	1,8-Naphthalinsulfon-säureamid		470	1000
30	3,5-Dihydroxy-4-methylbenzoesäure		463	> 5000
31	6-Amino-1,4-benzodioxan		453	> 5000
32	m-Aminoacetophenon		451	> 5000

^a Keine Inhibition bis zu einer Konzentration von 5 mM beobachtet.

5.3.2.2 Kinetische Charakterisierung von 4-Aminophthalsäurehydrazid

Nach dem Testen der ersten Vorschläge (Kapitel 5.3.2.1) wurde der Enzymassay im Rahmen dieser Arbeit im Labor von Prof. Klebe etabliert (Kapitel 4.1.8.2), wobei Änderungen bei der Versuchsdurchführung vorgenommen wurden. Eine dieser Änderungen war die Verkleinerung der Ansatzgrößen (400 μ l auf 76 μ l) und damit des Volumens (70 μ l auf 15 μ l) der Reaktionsmischung, das zur Präzipitierung der tRNA pro Zeiteinheit entnommen wurde. Die Fällung der tRNA erfolgte außerdem nicht mehr nach der Methode von Garcia, bei der die 70 μ l-Aliquots in 5 ml 10 %ige Trichloressigsäurelösung eingebracht und nach 30minütiger Inkubation die ausgefallene tRNA durch Saugfiltration auf GFC-Filter gesammelt wurde. In dieser Arbeit wurden 15 μ l-Aliquots aus dem Ansatz entnommen und nach direktem Pipettieren auf die GFC-Filter in 10 %ige TCA-Lösung eingebracht, so daß die Fällung direkt auf den Filtern erfolgte. Die kinetischen Parameter K_m und v_{max} der *Z. mobilis* TGT stimmten gut mit denen aus Garcias Labor überein (Tab. 14). Die Konzentration des HEPES-Puffers hatte im Bereich zwischen 10 und 1000 mM (pH 7,3) keinen Einfluß auf die Enzymaktivität. In einer früheren Studie in Tris-Puffer konnte ein deutlicher Aktivitätsverlust oberhalb von 10 mM Tris gefunden werden (Reuter et al., 1991).

Tab. 14: Vergleich der kinetischen Parameter der *Z. mobilis* TGT (w.t.), die im Labor von Klebe und Garcia nach etwas unterschiedlichen Methoden erhalten wurden.

Kinetische Parameter (Guanin als Substrat)	TGT(w.t.) Labor Klebe	TGT(w.t.) Labor Garcia
K_m	$0,38 \pm 0,12 \mu\text{M}$	$0,41 \pm 0,08 \mu\text{M}$
v_{max}	$48,8 \cdot 10^{-3} \pm 3,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}/\text{min}$	$58,4 \cdot 10^{-3} \pm 2,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}/\text{min}$
k_{cat}	$1,1 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$1,3 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
k_{cat}/K_m	$28,9 \cdot 10^{-3} \pm 8,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$31,7 \cdot 10^{-3} \pm 2,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Die kinetischen Parameter wurden auch für die tRNA^{Tyr} nach beiden Methoden bestimmt, indem eine sättigende [³H]-Guanin-Konzentrationen (20 μ M) und variable tRNA^{Tyr}-Konzentrationen (0,2 - 20 μ M) verwendet wurden (Tab. 15).

Tab. 15: Vergleich der kinetischen Parameter der tRNA^{Tyr}, die im Labor von Klebe und Garcia nach etwas unterschiedlichen Methoden erhalten wurden.

Kinetische Parameter (tRNA ^{Tyr} als Substrat)	TGT(w.t.) Labor Klebe	TGT(w.t.) Labor Garcia
K_m	$1,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$	$0,33 \pm 0,09 \mu\text{M}$
v_{\max}	$61,5 \cdot 10^{-3} \pm 4,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}/\text{min}$	$50,3 \cdot 10^{-3} \pm 2,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}/\text{min}$
k_{cat}	$1,4 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$1,1 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
k_{cat}/K_m	$13,9 \cdot 10^{-3} \pm 1,0 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$33,9 \cdot 10^{-3} \pm 3,0 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Die experimentellen Werte der kinetischen Parameter von tRNA^{Tyr} waren nach beiden Varianten des Enzymassays im Rahmen der Fehlergrenzen nahezu identisch (Tab. 15).

In dieser Arbeit wurden auch die Bedingungen für die Charakterisierung von Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT modifiziert. Zunächst wurde die Vorschrift für den Inhibitionsassay der *E. coli* TGT angewendet (Hoops et al., 1995b). Dabei wurden die Substrate (Guanin und tRNA) mit dem Inhibitor gemischt und die Enzymreaktion durch Zugabe der TGT gestartet. Jede Verbindung wurde bei zwei verschiedenen 8-[³H]-Guanin-Konzentrationen (1 μM und 2 μM), sättigenden tRNA^{Tyr}-Konzentrationen (8 μM) und mindestens fünf verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen gemessen. Die reziproken Anfangsgeschwindigkeiten wurden dann nach der Methode von Dixon (Kapitel 4.1.8.2) gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen und aus der Steigung m der Regressionsgeraden der K_i -Wert berechnet (Gleichung 4.1.8.2-2):

Gleichung 4.1.8.2-2

$$K_i = \frac{K_m}{v_{\max} \cdot [S]_t \cdot m}$$

Nach dieser Methode konnte ein K_i -Wert von 190 μM für 7-Methyl-preQ₁ (**18**) bzw. > 1000 μM für 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) gegenüber der *Z. mobilis* TGT gefunden werden. Der K_i -Wert von 7-Methyl-preQ₁ wurde in der Literatur jedoch mit 0,5 μM bezüglich der *E. coli* TGT angegeben (Hoops et al., 1995b), so daß analog zu den Versuchen im Labor von Garcia (Kapitel 5.3.2.1) ein Präinkubationsschritt eingeführt wurde. Dabei wurden die Inhibitoren zunächst für 20 Minuten mit der TGT in Abwesenheit der Substrate inkubiert. Nach anschließender Initiierung der Enzymreaktion durch Substratzugabe konnten deutliche Änderungen der Anfangsgeschwindigkeiten (v_i) in Abhängigkeit von der Inhibitor-konzentration beobachtet werden. Es wurde gefunden, daß der experimentelle Fehler in v_{\max}

mit Guanin als Substrat ($48,8 \cdot 10^{-3} \pm 3,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}/\text{min}$, Tab. 14) zu Ungenauigkeiten bei der Berechnung von K_i mit Gleichung 4.1.8.2-2 führt. Ein deutlicher Aktivitätsverlust (Abfall von v_{max}) war zu beobachten, wenn das Enzym länger als einen Tag bei 4°C aufbewahrt wurde. Daher wurde eine frische Charge der bei -20°C gelagerten TGT innerhalb eines Tages für die Inhibitionsbestimmungen aufgebraucht und in jeder Versuchsreihe die Anfangsgeschwindigkeit in Abwesenheit der zu testenden Verbindung (v_0 -Wert) bestimmt. Dieser v_0 -Wert wurde zur Auftragung von $v_0((K_m + [S])/K_m)/v_i$ gegen die Inhibitor-Konzentration $I [\mu\text{M}]$ verwendet. Aus der reziproken Steigung m der Regressionsgeraden konnte der K_i -Wert berechnet werden (Gleichung 4.1.8.2-3):

Gleichung 4.1.8.2-3

$$\frac{v_0}{v_i} \cdot \frac{K_m + [S]}{K_m} = \frac{1}{K_i} \cdot [I] + \left(\frac{[S]}{K_m} + 1 \right)$$

Als Beispiel ist die Auftragung nach Gleichung 4.1.8.2-3 (Kapitel 4.1.8.2) für eine Versuchsreihe mit 4-Aminophthalsäurehydrazid ($2,5 - 50 \mu\text{M}$) und $1 \mu\text{M}$ 8- $^{[3]\text{H}}$ -Guanin in Abb. 20 gezeigt.

Aus der Steigung der Regressionsgeraden ($m = 0,1269 \mu\text{M}^{-1}$) der Auftragung aus Abb. 20 errechnet sich folgender K_i -Wert:

$$K_i = \frac{1}{m} = \frac{1}{0,1269 \mu\text{M}^{-1}} = \underline{7,9 \mu\text{M}}$$

In einer zweiten Versuchsreihe mit $2 \mu\text{M}$ 8- $^{[3]\text{H}}$ -Guanin wurde ein K_i -Wert von $8,7 \mu\text{M}$ gefunden, so daß die Methode sehr gut reproduzierbar war. Die Affinität von 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) wurde daher mit $8,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$ angegeben.

Nach der gleichen Methode wurde für 7-Methyl-preQ₁ (**18**) und 2-Amino-5-methyl-7H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-on (**12**) ein K_i -Wert von $5,1 \mu\text{M}$ bzw. $61 \mu\text{M}$ erhalten. In einer früheren Studie wurden für diese Verbindungen Inhibitionskonstanten von $0,5 \mu\text{M}$ bzw. $506 \mu\text{M}$ gegenüber der *E. coli* TGT angegeben (Hoops et al., 1995b).

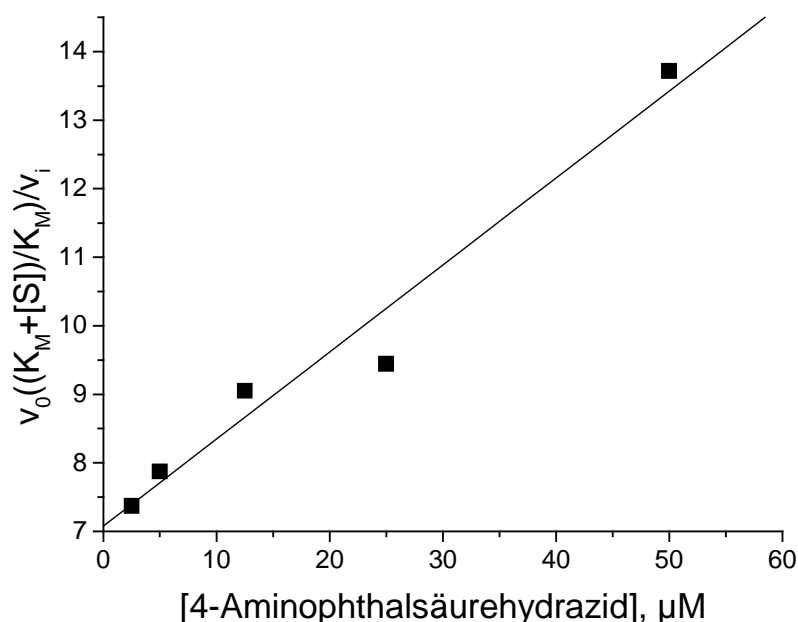
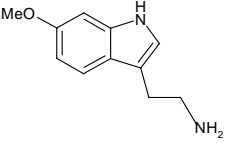
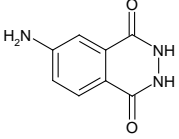
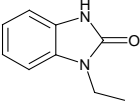
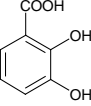
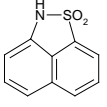
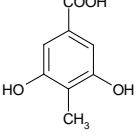
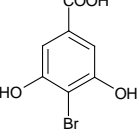
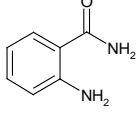
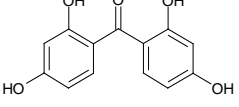


Abb. 20: Inhibition der *Z. mobilis* TGT in Anwesenheit von 4-Aminophthalsäurehydrazid (24). Die Enzymreaktion wurde nach 20minütiger Präinkubation der TGT mit variablen Inhibitor-konzentrationen (2,5 - 50 μM) bei 37°C durch Zugabe der Substrate (1 μM 8- ^3H]-Guanin und 8 μM tRNA^{Tyr}) gestartet. Die reziproke Steigung der Regressionsgeraden einer Auftragung von $v_0((K_m + [S])/K_m)/v_i$ gegen die Inhibitor-Konzentration I [μM] liefert nach Gleichung 4.1.8.2-3 den K_i -Wert.

5.3.3 Kristallographische Charakterisierung der Vorschläge

Die im Enzymassay charakterisierten Vorschläge von LUDI (Kapitel 5.3.3) wurden zum „Soaking“ in Kristalle der *Z. mobilis* TGT eingesetzt (Kapitel 4.2.2), um Hinweise über ihre potentiellen Bindungsmodi zu erhalten. Nach der kristallographischen Verfeinerung der Datensätze (Tab. 16) erhielt man für die sieben Verbindungen, die im Enzymassay schwache Affinitäten zeigten, jeweils nichtinterpretierbare positive $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichten im Bereich der potentiellen Substrat-Bindungsstelle. Für die 2,3-Dihydroxybenzoesäure (28) konnte eine schwache Affinität gemessen werden ($K_i = 3000 \mu\text{M}$), so daß einige Derivate dieser Strukturklasse auf eine mögliche Bindung durch „Soaking“ getestet werden sollten.

Tab. 16: Soaking-Versuche der *Z. mobilis* TGT mit Verbindungen aus der ACD-Suche mit LUDI und weiteren Leitstruktur-Ideen. Nur mit 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) konnte eine interpretierbare positive $|F_o - F_c|$ -Dichte im Bereich der Bindetasche erhalten werden.

#	Verbindung	Struktur	K_i [μ M]	Auflösung	Dichte
23	6-Methoxytryptamin		$> 5000^a$	1,85 Å	— ^c
24	4-Aminophthalsäurehydrazid		$8,3 \pm 0,4$	1,95 Å	☼ ^c
27	1-Ethylbenzimidazolin-2-on		> 5000	2,0 Å	— ^c
28	2,3-Dihydroxybenzoesäure		3000	2,0 Å	— ^c
29	1,8-Naphthalin-sulfonsäureamid		1000	2,0 Å	— ^c
30	3,5-Dihydroxy-4-methylbenzoesäure		> 5000	2,0 Å	— ^c
33	3,5-Dihydroxy-4-brombenzoesäure		— ^b	2,3 Å	— ^c
34	Anthranilamid		2000	1,9 Å	— ^c
35	2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon		— ^b	2,1 Å	— ^c

^a Keine Inhibition bis zu einer Konzentration von 5 mM beobachtet.

^b Mögliche Inhibition wurde nicht untersucht.

^c Interpretierbare $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte für das „gesoakte“ Molekül nach Verfeinerung des Datensatzes (—, nicht interpretierbar; ☼, interpretierbar)

Dabei wurde 3,5-Dihydroxy-4-brombenzoesäure (**33**) verwendet, um die vermutlich schwach populierte Verbindung anhand ihres elektronenreichen Bromatoms in der Bindetasche besser lokalisieren zu können. Dennoch konnte nach der Verfeinerung keine positive $|F_o - F_c|$ -Dichte identifiziert werden, die einen Hinweis auf eine nennenswert Population von 3,5-Dihydroxy-4-brombenzoesäure in der Bindetasche verwiesen hätte. Als weitere Verbindungen mit einer verwandten Struktur von 2,3-Dihydroxybenzoesäure wurde das Anthranilamid (**34**) und das 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (**35**) durch „Soaking“ getestet, jedoch ergab die Analyse der verfeinerten Kristallstruktur keine interpretierbare positive $|F_o - F_c|$ -Dichte (Tab. 16).

Dagegen war die Position eines 4-Aminophthalsäurehydrazid-Moleküls eindeutig durch positive $|F_o - F_c|$ -Dichte in der Bindetasche definiert.

5.3.4 Kristallstruktur der TGT in Komplex mit 4-Aminophthalsäurehydrazid

Die kristallographische Verfeinerung (Kapitel 4.2.3) des Datensatzes (Auflösung bis 1,95 Å, Tab. 17) erfolgte unter Verwendung der apo-TGT Struktur (PDB-Code: **1PUD**) als Startmodell (Kapitel 5.1.1.2).

Analog zu preQ₁ (**3**) ist das 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) in der amphiphilen Tasche interkaliert zwischen Met²⁶⁰, Tyr¹⁰⁶ und Cys¹⁵⁸ (Abb. 21). Spezifische Wechselwirkungen über H-Brücken liegen zwischen folgenden Resten vor: Asp¹⁵⁶ und den NH-Gruppen des Hydrazids (2,9 Å und 3,2 Å), dem 2-Carbonylsauerstoff und dem Amid-Stickstoff von Gly²³⁰ (2,7 Å) bzw. der NH₂-Gruppe von Gln²⁰³ (3,0 Å). Das O-Atom der 1-Carbonylgruppe hat Kontakt zu drei Wassermolekülen (2,8 Å, 2,9 Å und 3,1 Å) und die 4-NH₂-Gruppe bildet eine H-Brücke zu dem Carbonylsauerstoff von Leu²³¹ (3,0 Å). Eine Überlagerung anhand der Koordinaten der C α -Atome der experimentellen und der mit LUDI gedockten Struktur von TGT·**24** zeigt eine sehr gute Übereinstimmung (RMS-Wert: 0,27 Å) für die Position von 4-Aminophthalsäurehydrazid (Abb. 22).

Tab. 17: Datensammlung und Verfeinerung des Komplexes von *Z. mobilis* TGT mit 4-Aminophthal-säurehydrazid (24).

	TGT-24
Raumgruppe	C2
Zellkonstanten	
a (Å)	90,79
b (Å)	64,96
c (Å)	70,42
β (deg)	96,47
Auflösungsbereich (Å)	40-1,95
Zahl der gemessenen Reflektionen	306.195
Zahl der unabhängigen Reflektionen	29.806
Vollständigkeit der Daten	97,9 (95,3)
(%, hoher Auflösungsbereich)	
R_{symm}^a für alle Daten	6,2 (29,1)
(%, hoher Auflösungsbereich)	
R_{free}^b (%)	21,1
R-Faktor ^b (%)	17,6
Zahl der Wassermoleküle	456
RMS-Abweichung, Winkel (deg)	1,423
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,006
PDB-Eintrag	1ENU

^a $R_{\text{symm}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, wobei I die gemessene Intensität und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.

^b Der R_{free} -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflektionen aus ~10% der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet.

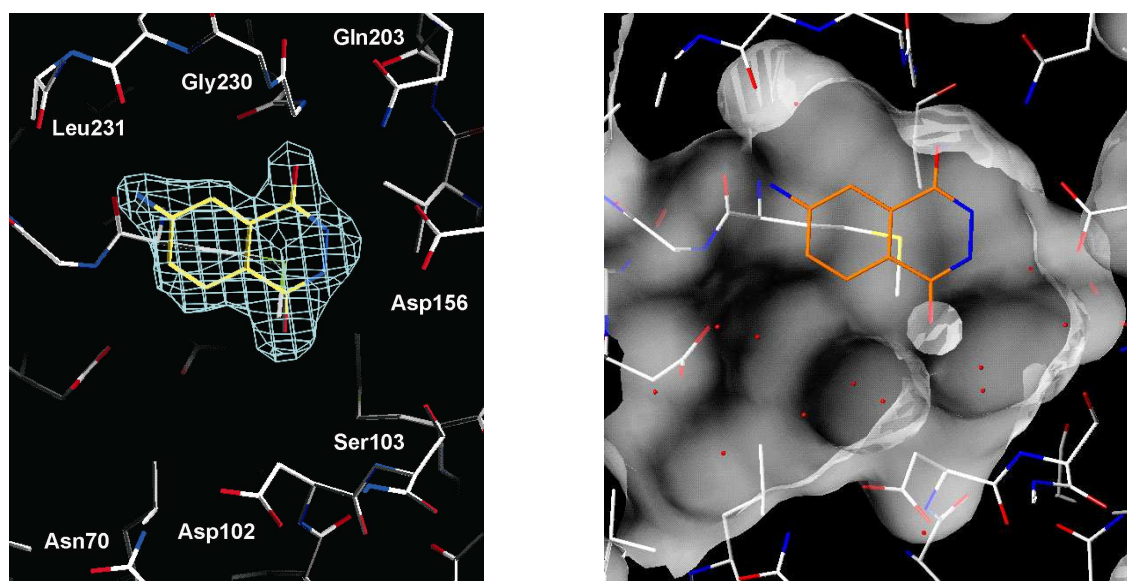


Abb. 21: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit 4-Aminophthalsäurehydrazid (24) bei einer Auflösung von 1,95 Å. (a) Das Inhibitormolekül ist eindeutig in der $2F_o-F_c$ -Differenzelektronendichte (hellblau, konturiert auf 1σ) des verfeinerten Strukturmodells definiert (links). Wasserstoffbrücken zwischen 24 und der TGT liegen über folgende Reste vor: Asp¹⁵⁶ und den NH-Gruppen des Hydrazids (2,9 Å und 3,2 Å), dem O-Atom der 2-Carbonylgruppe und dem Amid-Stickstoff von Gly²³⁰ (2,7 Å) bzw. der NH₂-Gruppe von Gln²⁰³ (3,0 Å). Das O-Atom der 1-Carbonylgruppe hat Kontakt zu drei Wassermolekülen (2,8 Å, 2,9 Å und 3,1 Å) und die 4-NH₂-Gruppe bildet eine H-Brücke zu dem Carbonylsauerstoff von Leu²³¹ (3,0 Å). (b) Darstellung der wasserzugänglichen Connolly-Oberfläche (Kapitel 5.4.1) im Bereich der Bindetasche (rechts).



Abb. 22: Überlagerung („Cα-fit“) der Kristallstruktur von TGT-24 und der von LUDI vorgeschlagenen Position von 4-Aminophthalsäurehydrazid. Die von LUDI gedockte Position (orange) von 24 stimmt sehr gut (RMS-Wert: 0,27 Å) mit der experimentell gefundenen Bindungsposition in TGT-24 überein.

5.4 Zweiter Design-Zyklus mit 4-Aminophthalsäurehydrazid als Leitstruktur

Die gut definierte Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) bei 1,95 Å Auflösung (Kapitel 5.3.3) sowie eine Affinität im unteren mikromolaren Bereich ($K_i = 8,3 \mu\text{M}$, Kapitel 5.3.2) waren ideale Voraussetzungen, diese Verbindung als Leitstruktur für das weitere strukturbasierte Wirkstoffdesign zu verwenden.

5.4.1 Analyse der Bindetasche

Zunächst wurde die Bindetasche der *Z. mobilis* TGT im Bereich des gebundenen 4-Aminophthalsäurehydrazids analysiert, um kleine unbesetzte Taschen zu identifizieren, die von eingeführten Gruppen eines strukturell erweiterten Liganden ausgefüllt werden könnten. Dazu wurde eine wasserzugängliche Connolly-Oberfläche in der Bindetasche mit SYBYL (SYBYL, 1999) generiert und die lokalen elektrostatischen Eigenschaften anhand einer Farbkodierung auf dieser abgebildet (Abb. 23 a). Zunächst wurden in SYBYL alle Wasserstoffatome der TGT-**24**-Struktur generiert (\rightarrow *BUILD*⁶ \rightarrow *EDIT* \rightarrow *ADD HYDROGENS*) und Ladungen nach der Methode von Gasteiger und Masili (Gasteiger & Marsili, 1980) für alle Atome berechnet (\rightarrow *COMPUTE* \rightarrow *CHARGE* \rightarrow *GASTEIGER*). Dann wurde eine Connolly-Oberfläche für TGT-**24** (ohne Wasser und Inhibitor) im Bereich der Bindetasche (Radius von 12 Å um Tyr¹⁰⁶) berechnet (\rightarrow *VIEW* \rightarrow *SURFACE* \rightarrow *MOLCAD SURFACE*) und die berechneten Ladungen mit einer Farbkodierung (blau: negative Ladung, rot: positive Ladung) auf dieser Oberfläche abgebildet (Abb. 23 a). Die elektrostatische Oberfläche zeigt eine große Tasche mit negativen Ladungen (blau) im Bereich der Seitenketten von Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰, die mit einigen Wassermolekülen gefüllt ist. Da Asp¹⁰² als Nukleophil am Basenaustausch beteiligt ist (Kapitel 2.4.3), wird in diesem Bereich vermutlich die Bindungsstelle für den Riboserest der tRNA zu suchen sein. Daher sind in dieser Tasche kleinere Ringstrukturen (5- oder 6-Ringe) mit Donor-Gruppen als mögliche Substituenten von 4-Aminophthalsäurehydrazid denkbar. Die Generierung von Wechselwirkungszentren mit LUDI ergab wie erwartet H-Donoren in der Umgebung von Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ (Abb. 23 b).

⁶ SYBYL-Befehle sind *KURSIV* dargestellt.

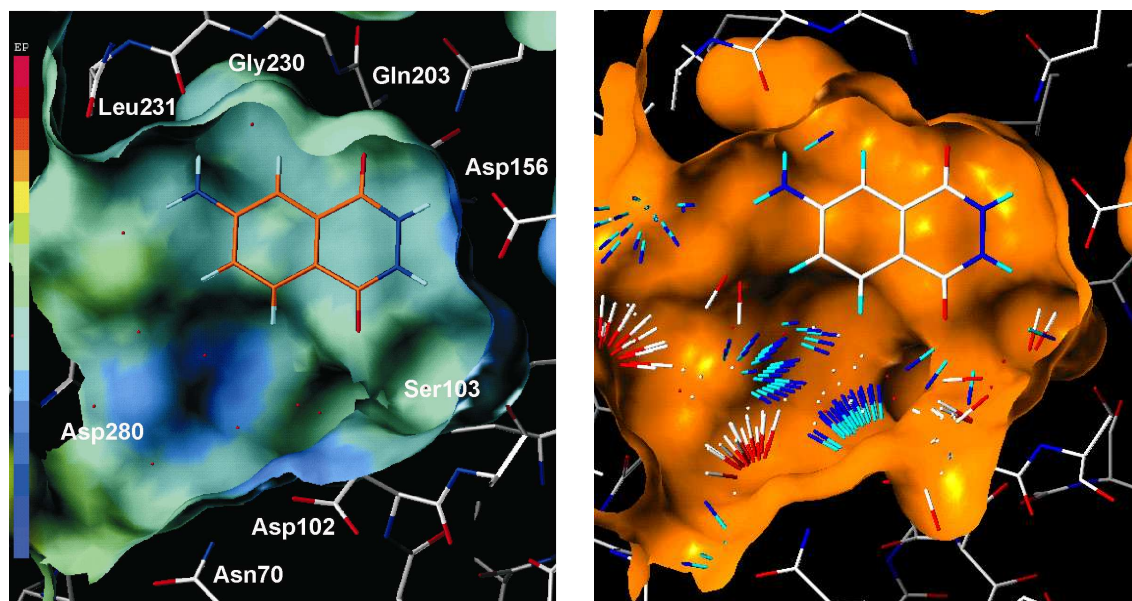


Abb. 23: Analyse der Bindetasche des kristallographisch charakterisierten Komplexes aus *Z. mobilis* TGT und 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**). (a) Darstellung der wasserzugänglichen Connolly-Oberfläche mit den darauf abgebildeten elektrostatischen Eigenschaften (blau: negative Ladung, rot: positive Ladung) des TGT-**24**-Komplexes im Bereich der Bindetasche. In Nachbarschaft zu dem Liganden wurde eine polare Tasche gefunden, die von den Seitenketten von Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ geformt und mit einigen Wassermolekülen besetzt ist (links). (b) Generierte LUDI-Wechselwirkungszentren (blaue Vektoren: H-Donor, rot-weiße Vektoren: H-Akzeptor, weiße Kugeln: lipophile Zentren) im Bereich von Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ (rechts).

Aufgrund der Kristallstruktur erschien daher die Einführung von Substituenten in der 5- oder 6-Position von 4-Aminophthalsäurehydrazid als ein geeigneter Ansatzpunkt zur Derivatisierung der Leitstruktur (Abb. 24).

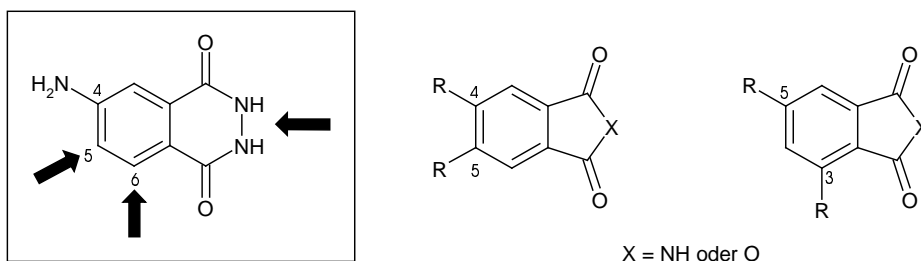


Abb. 24: Derivatisierung der Leitstruktur 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**). Die Hydrazidfunktion kann in einer einfachen Reaktionsfolge aus dem Phthalsäureanhydrid bzw. dem Phthalsäureimid als Zwischenschritt erhalten werden. Aufgrund der Kristallstruktur erschien die Einführung von Substituenten an der 5- oder 6-Position der Leitstruktur als sinnvoll.

Es sollte auch die Frage geklärt werden, ob die Hydrazidfunktion von **24** durch eine Imidgruppe ersetzt werden kann, d.h. welche Auswirkungen der Verlust einer der beiden

H-Brücken zu Asp¹⁵⁶ haben würde. Phthalsäureanhydride kann man z.B. durch Schmelzen mit Harnstoff in die Phthalsäureimide überführen. Erst im Folgeschritt lassen sich daraus durch einfache Umsetzung mit Hydrazin die Phthalsäurehydrazide erhalten. Daher erschienen 4,5- bzw. 3,5-disubstituierte Derivate des Phthalsäureanhydrids bzw. der Phthalsäure als geeignete Grundbausteine zur Synthese von Leitstruktur-Analoga (Abb. 24). Idealerweise sollten diese Derivate in 4- bzw. 6-Position eine Aminogruppe oder eine Gruppe enthalten, die leicht in eine Aminogruppe überführt werden kann, da in dieser Position eine wichtige H-Brücke zu Leu²³¹ gefunden wurde (Kapitel 5.3.4). Im nächsten Schritt wurde daher eine Datenbanksuche in dem *Available Chemical Directory* (ACD) (MDL, 1997) nach solchen Derivaten des Phthalsäureanhydrids und -imids durchgeführt.

5.4.2 Datenbanksuche nach Phthalsäure-Derivaten

Zunächst sollte eine 2D-Suche mit dem Programm UNITY (UNITY, 2000) in dem *Available Chemical Directory* (ACD) (MDL, 1997) durchgeführt (Kapitel 4.7) werden, um bekannte Phthalsäure-Derivate zu identifizieren, die sich als Vorschläge zur Derivatisierung der Leitstruktur 4-Aminophthalsäurehydrazid eignen.

Die Konnektivität der Atome der Phthalsäure-Derivate wurde in Form eines SLN-Codes (Kapitel 4.7) als Query für die Datenbanksuche verwendet (Tab. 18).

Tab. 18: Verwendete SLN-Codes zur 2D-Suche nach Phthalsäure-Derivaten mit dem Programm UNITY in dem *Available Chemical Directory* (ACD).

Funktionelle Gruppe	SLN
Phthalsäure	C[1]:C:C:C(C(:C:@1)C(=O)O)C(=O)O <v=6>
Phthalyl-C=O(NHNH)-C=O	C[1]:C:C:C[4]:C(:C@1)C(=O)NHNH@4=O <v=4>
Phthalyl-C=O(O)-C=O	C[1]:C:C:C[4]:C(:C@1)C(=O)OC@4=O <v=4>
Phthalyl-C=O(N-H)-C=O	C[1]:C:C:C[4]:C(:C@1)C(=O)NHC@4=O <v=4>

Das vorgegebene 2D-Kriterium für substituierte Phthalsäuren konnten 292 Verbindungen aus insgesamt 183.564 Datenbank-Einträgen erfüllen. Der Großteil dieser Treffer waren Phthalsäureester, deren Strukturmuster jedoch nicht der definierten Suchanfrage entsprachen. Als Derivate des Phthalsäurehydrazids konnten 13 Verbindungen gefunden werden, jedoch waren dies vorwiegend NH₂-alkylierte Derivate des 4-Aminophthalsäurehydrazids. Die Suche

nach Phthalsäureanhydriden ergab 71 Treffer. Einige der gefundenen Struktur motive, die häufiger unter den gefundenen Datenbank-„Hits“ auftraten, sind in Abb. 25 dargestellt. Von den aufgeführten Verbindungen zeigte nur das 3,5-Dichlorphthalsäureanhydrid (**36**) das erwünschte Substitutionsmuster (3,5-Disubstitution) am Aromaten.

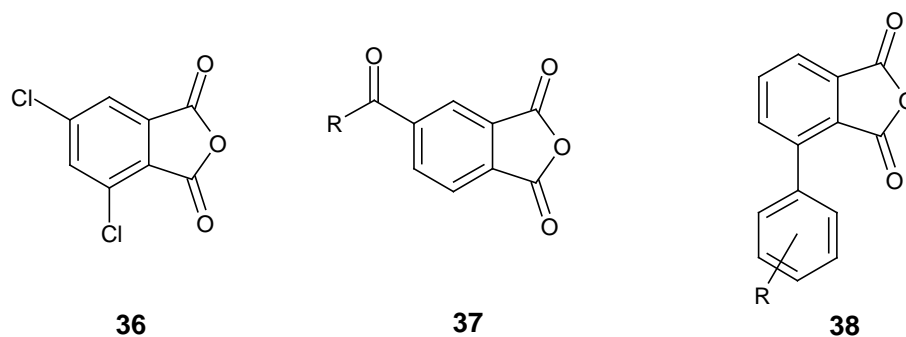


Abb. 25: Einige Vertreter der Phthalsäureanhydride, die bei der 2D-Suche im *Available Chemical Directory* (ACD) gefunden wurden.

Bei der Suche nach Phthalsäureimiden wurden 25 Datenbank-Hits gefunden. Die Analyse der gefundenen Phthalsäureimide ergab einige interessante Strukturen, die z.T. bereits die erwünschte 4,5-Disubstitution mit unterschiedlichen Gruppen am Aromaten enthielten (**41**, Abb. 26).

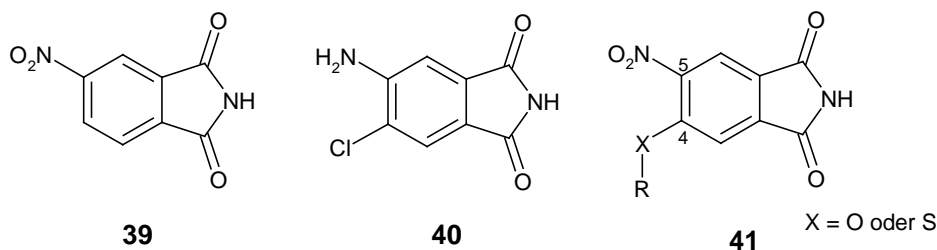


Abb. 26: Einige Vertreter der Phthalsäureimide, die bei der 2D-Suche im *Available Chemical Directory* (ACD) gefunden wurden.

Mit diesen Informationen wurde eine Suche nach Derivaten von 5-Nitrophthalimid mit S- bzw. O-Substituenten in 3- bzw. 4-Position (Abb. 26) in der Beilstein-Datenbank durchgeführt. Dies erbrachte eine sehr interessante Synthesemethode (Fischer & Kvita, 1991), nach der Thiosalicylsäure (**42**) durch nukleophile aromatische Substitution in die 3-Position von N-Butyl-3,5-dinitrophthalimid (**43**) bzw. in die 4-Position von N-Methyl-4,5-dichlorphthalimid (**44**) eingeführt werden kann (Abb. 27).

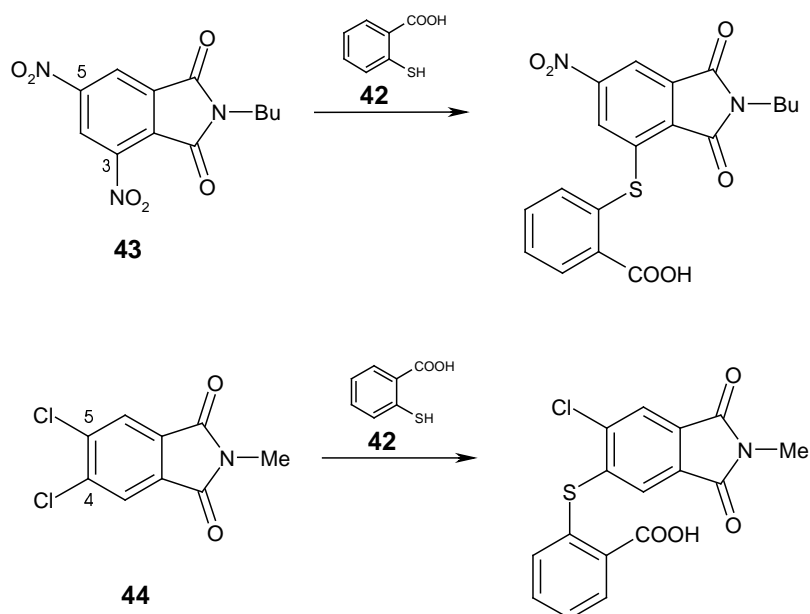


Abb. 27: Synthesemethode (Fischer & Kvita, 1985) zur Einführung von Thiosalicylsäure (42) durch nukleophile aromatische Substitution in die 3-Position von N-Butyl-3,5-dinitrophthalimid (43) bzw. in die 4-Position von N-Methyl-4,5-dichlorphthalimid (44).

Die gleichen Autoren hatten bereits einige Jahre zuvor die regioselektive Einführung von Thiolen in die 3-Position von 3,5-Dinitrophthalsäureimid (45, Abb. 28) untersucht (Fischer & Kvita, 1985).

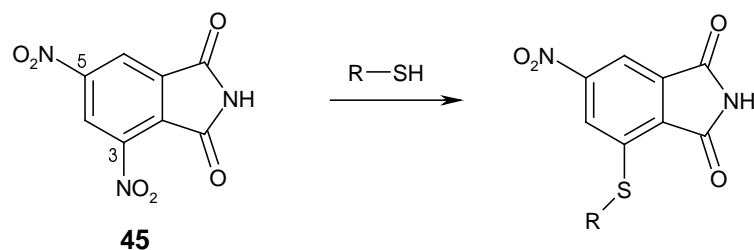


Abb. 28: Regioselektive Einführung von Thiolen in die 3-Position von 3,5-Ditrophthalsäureimid (45) durch nukleophile aromatische Substitution.

Diese Synthesestrategie erschien ideal, da in der Arbeit von Fischer & Kvita (1985) eine breite Vielfalt an Thiolen (aliphatische Thiole, Thiophenole und 1-Methyltetrazol-5-thiol) durch eine einfach durchzuführende, nukleophile aromatische Substitution in guten Ausbeuten erhalten wurde. Die Substitution mit S-Nukleophilen erfolgte regioselektiv an der 3-Position, da die Nitrogruppe aufgrund sterischer Wechselwirkungen mit der benachbarten Carbonylgruppe aus der aromatischen Ringebene herausgedreht und dadurch die C-N-Bindung geschwächt ist. Methoden zur Reduktion aromatischer Nitrogruppen in die

entsprechenden Amine waren ebenfalls in der Literatur beschrieben (Fischer & Kvita, 1985), so daß **45** bzw. ein Substitutionsprodukt in einer einfachen Synthesefolge in das entsprechende Derivat von 4-Aminophthalsäurehydrazid überführbar war. Ein weiterer Vorteil dieser Synthese lag darin, daß mit **45** eine gemeinsame Vorstufe für zwei weitere Derivate der Leitstruktur, 3,5-Diaminophthalsäureimid (**46**) und 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**47**), erhalten werden konnten. Mit diesen Verbindungen konnte der bereits erwähnte Einfluß (Kapitel 5.4.1) der Hydrazid- gegenüber der Imid-Gruppe auf die Bindungsaffinität untersucht werden. Daher wurde zunächst die Synthese und Bindungseigenschaften von **46** und **47** ausgehend von 3,5-Dinitrophthalsäureimid (**45**) verfolgt (Kapitel 5.4.3), die Derivatisierung von **45** mit Thiolen wird nachfolgend (Kapitel 5.5) besprochen.

5.4.3 Bindungseigenschaften von Phthalsäureimiden und -hydraziden

5.4.3.1 Derivate von 4-Aminophthalsäurehydrazid

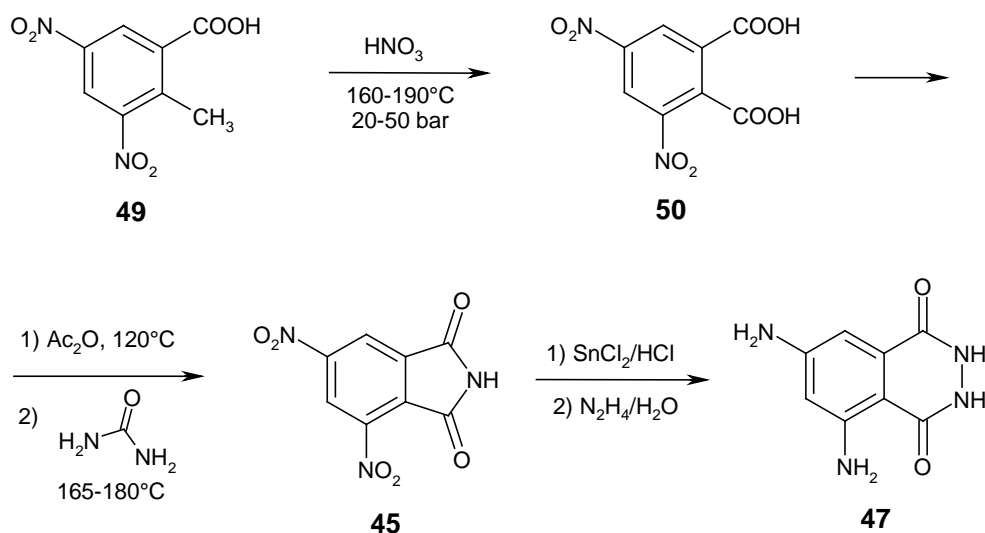
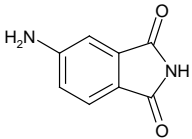
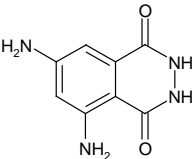
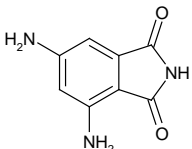
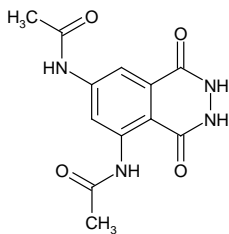


Abb. 29: Synthese von 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**47**) ausgehend von 3,5-Dinitro-2-methylbenzoesäure (**49**). Im ersten Schritt erfolgte die Oxidation der Methylgruppe von **49** mit Salpetersäure im Autoklaven zur 3,5-Dinitrophthalsäure (**50**). Durch Reaktion mit Essigsäureanhydrid und Schmelzen des 3,5-Dinitrophthalsäureanhydrids mit Harnstoff wurde das Phthalsäureimid (**45**) erhalten. Durch Reduktion von **50** mit Zinn(II)chlorid und Umsetzung mit Hydrazinhydrat gelang die Überführung in das 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**47**).

Das 4-Aminophthalsäureimid (**48**, Tab. 19) konnte von Aldrich bezogen und direkt getestet werden. Zur Einführung von Substituenten in der 6-Position von 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) wurde von 3,5-Dinitro-2-methylbenzoesäure ausgegangen (**49**, Abb. 29), das mit Salpetersäure im Autoklaven (160-190°C, 20-50 bar) zur 3,5-Dinitrophthalsäure (**50**) oxidiert werden konnte (Wegler, 1937). Die 3,5-Dinitrophthalsäure (**50**) konnte mit Essigsäureanhydrid zunächst in das Anhydrid von **50** und anschließend durch Schmelzen mit Harnstoff in das 3,5-Dinitrophthalsäureimid (**45**) überführt werden. Durch Reduktion mit Zinn(II)chlorid wurde das 3,5-Diaminophthalsäureimid (**51**, Tab. 19) und daraus durch Umsetzung mit Hydrazinhydrat das 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**47**) erhalten (Gundermann & Drawert, 1962).

Die Affinitäten der Verbindungen **47**, **48** und **51** wurden analog zu 4-Aminophthalsäurehydrazid bestimmt (Kapitel 5.3.2.2). Anschließend erfolgte ein „Soaking“ in Kristalle der *Z. mobilis* TGT (Kapitel 4.2.2) zur Bestimmung des Bindungsmodus (Tab. 19).

Tab. 19: Bindungsaffinitäten und kristallografische Bestimmung von Derivaten des 4-Aminophthalsäurehydrazids (**24**).

#	Verbindung	Struktur	K _i [μM]	Auflösung	Dichte
48	4-Aminophthalsäureimid		4,8 ± 0,3	1,95 Å	— ^a
47	3,5-Diaminophthalsäurehydrazid		0,2 ± 0,1	1,85 Å	☼ ^a
51	3,5-Diaminophthalsäureimid		2,1 ± 1,4	1,95 Å	☼ ^a
52	3,5-Di-(N-acetyl-amino)-phthalsäurehydrazid		4,5 ± 1,6	1,8 Å	— ^a

^a Interpretierbare |F_o-F_c|-Differenzelektronendichte für das „gesoakte“ Molekül nach Verfeinerung des Datensatzes (—, nicht interpretierbar; ☼, interpretierbar).

Die Verbindungen **47**, **48** und **51** zeigten Bindungskonstanten im unteren mikromolaren Bereich, wobei 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**47**) mit $K_i = 0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ die höchste Affinität hatte. Die Einführung einer zweiten Aminogruppe in 6-Position von 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**, $K_i = 8,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$) erbrachte somit eine Affinitätssteigerung um den Faktor 40. Ein Ersatz der Hydrazid- durch eine Imidgruppe von **47** resultierte diesbezüglich in einer vierfach höheren Affinität (**51**, $K_i = 2,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$). Im Fall von 4-Aminophthalsäureimid (**48**, $4,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$) lag die Inhibitionskonstante etwas niedriger als die des Hydrazids (**24**, $K_i = 8,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$).

Tab. 20: Datensammlung und Verfeinerung der Komplexe von *Z. mobilis* TGT und 3,5-Diaminophthalsäureimid (51**) und 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**47**).**

	TGT· 51	TGT· 47
Raumgruppe	C2	C2
Zellkonstanten		
a (Å)	90,88	90,67
b (Å)	65,09	64,94
c (Å)	70,70	71,05
β (deg)	96,37	96,61
Auflösungsbereich (Å)	40-1,8	35-1,85
Zahl der gemessenen Reflektionen	341.895	322.171
Zahl der unabhängigen Reflektionen	38.086	35.090
Vollständigkeit der Daten	95,5 (90,9)	96,3 (93,4)
(%, hoher Auflösungsbereich)		
R_{symm}^a für alle Daten	5,1 (23,4)	6,0 (33,6)
(%, hoher Auflösungsbereich)		
R_{free}^b (%)	24,0	23,8
R-Faktor ^b (%)	19,5	19,5
Zahl der Wassermoleküle	458	418
RMS-Abweichung, Winkel (deg)	1,359	1,431
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,006	0,006

^a $R_{\text{symm}} = \Sigma |I - \langle I \rangle| / \Sigma I$, wobei I die gemessene Intensität und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.

^b Der R_{free} -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflektionen aus ~10% der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet.

Die Strukturbestimmung (Tab. 20) der Verbindungen **47**, **48** und **51** war nur in zwei Fällen erfolgreich (**47** und **51**). Dabei wurden analoge Bindungsmodi wie für 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**, Abb. 21, Kapitel 5.3.4) gefunden. Für **48** konnte keine interpretierbare positive $|F_o - F_c|$ -Dichte gefunden werden, was vielleicht auf multiple Bindungsmodi und eine niedrige Populierung der Verbindung in der Bindetasche zurückzuführen war. Die Orientierung von 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**47**) in der Bindetasche ließ sich eindeutig anhand der positiven $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte bestimmen. Im verfeinerten Strukturmodell von TGT-**47** bildet die 5-NH₂-Gruppe eine H-Brücke zu Leu²³¹ (2,8 Å), für die 3-NH₂-Gruppe werden jedoch keine direkten Wechselwirkungen zu Proteinatomen gefunden (Abb. 30). Zwei Wassermoleküle liegen in H-Brücken-Distanz zwischen der 3-NH₂-Gruppe (3,3 Å and 3,2 Å) und Asp¹⁰² (2,9 Å and 3,3 Å).

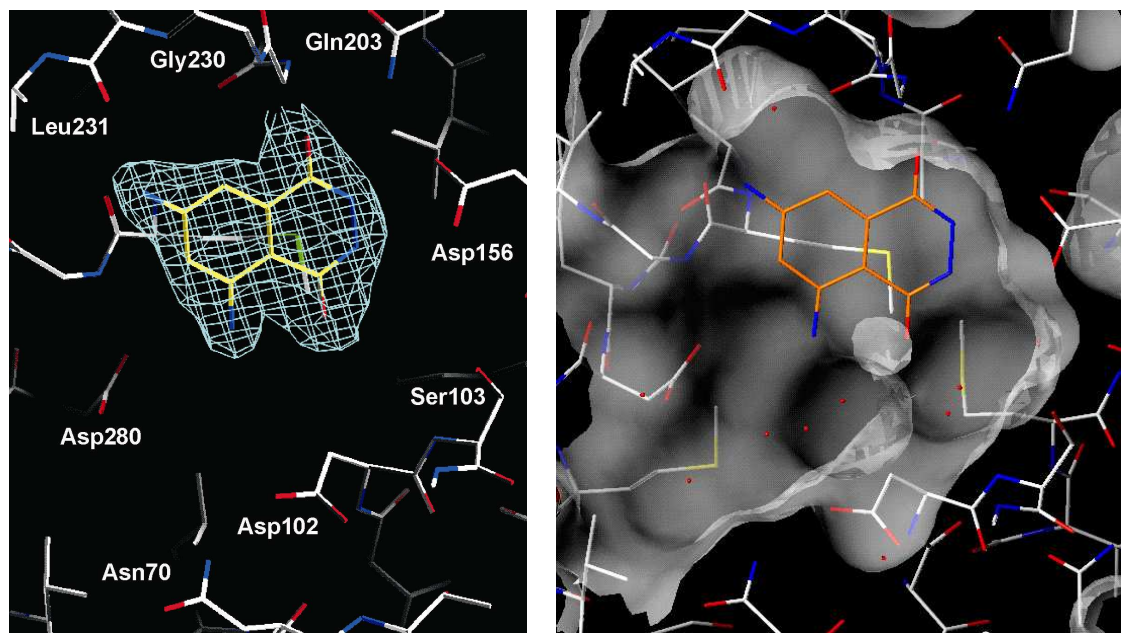


Abb. 30: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (47**) bei einer Auflösung von 1,85 Å.** (a) Das Inhibitor-molekül ist eindeutig in der $2F_o - F_c$ -Differenzelektronendichte (hellblau, konturiert auf 1σ) des verfeinerten Strukturmodells definiert (links). Die 5-NH₂-Gruppe ist über eine H-Brücke zu Leu²³¹ (2,8 Å) orientiert. Zwei Wassermoleküle liegen in H-Brücken-Distanz zwischen der 3-NH₂-Gruppe (3,3 Å and 3,2 Å) und Asp¹⁰² (2,9 Å and 3,3 Å) (rechts). (b) Darstellung der wasserzugänglichen Connolly-Oberfläche (Kapitel 5.4.1) im Bereich der Bindetasche (rechts).

Die Kristallstruktur der TGT im Komplex mit 3,5-Diaminophthalsäureimid (**51**) zeigte nach dem ersten Verfeinerungszyklus eine zerissene Form der positiven $|F_o - F_c|$ -Dichte im Bereich der potentiellen Bindestelle (Abb. 31 a). Die Ausbreitung dieser Dichte sprach für multiple Bindungsmodi, wobei die 3-Aminogruppe von **51** in einem möglichen Bindungsmodus zu

Leu²³¹ (2,8 Å) orientiert ist. Diese Orientierung wurde für den zweiten Verfeinerungszyklus verwendet, jedoch resultierte keine Verbesserung der 2F_o-F_c-Dichte (Abb. 31 b). In diesem Strukturmodell ist das Imid-NH über eine schwache H-Brücke zu einem Carboxylatsauerstoffatom von Asp¹⁵⁶ (3,6 Å) und die 2-Carbonylgruppe zu dem Amid-Stickstoff von Gly²³⁰ (2,7 Å) bzw. der NH₂-Gruppe von Gln²⁰³ (3,2 Å) orientiert. Die 5-NH₂-Gruppe hat im äußeren Bereich der Bindetasche Kontakt zu zwei Wassermolekülen (3,3 Å bzw. 3,4 Å).

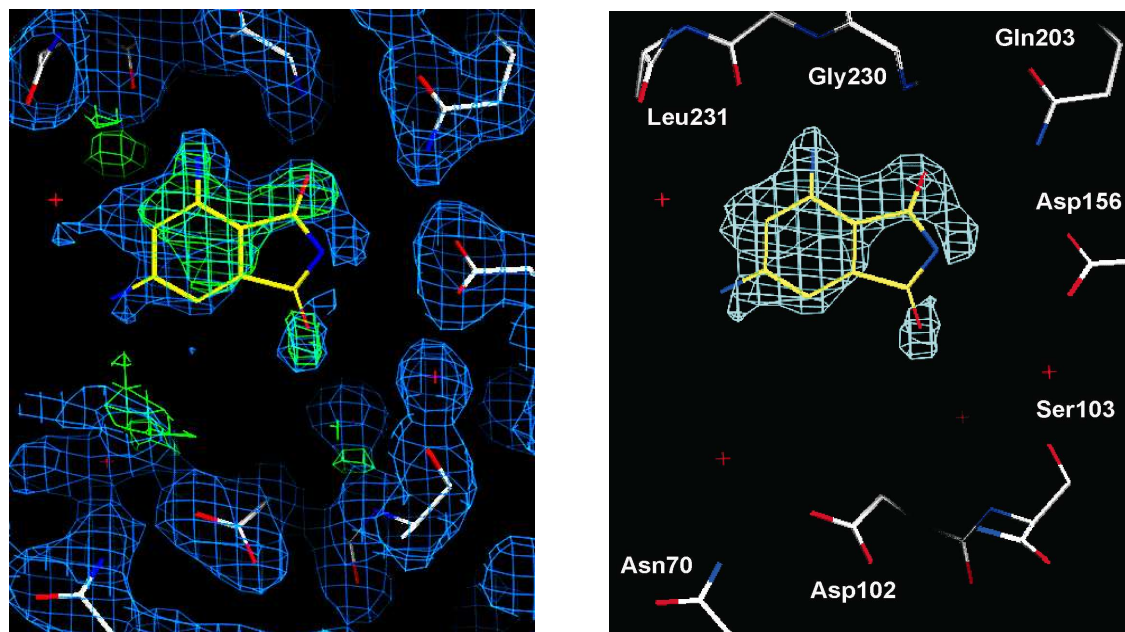


Abb. 31: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit 3,5-Diaminophthalsäureimid (51) bei einer Auflösung von 1,8 Å. (a) Die positive [F_o-F_c]-Differenzelektronendichte (grün, konturiert auf 2 σ) des verfeinerten Strukturmodells deutet auf multiple Bindungsmodi von 51 (links). (b) In einer möglichen Orientierung bildet die 3-NH₂-Gruppe eine H-Brücke zu Leu²³¹ (2,8 Å), während die 5-NH₂-Gruppe Kontakt zu zwei Wassermolekülen (3,3 Å und 3,4 Å) hat (rechts). Gezeigt ist die 2F_o-F_c-Differenzelektronendichte (hellblau, konturiert auf 1 σ).

Die Phthalsäurehydrazide bzw. -imide (47, 48 und 51) waren in DMSO löslich, jedoch konnte beim Verdünnen der DMSO-Lösungen (etwa oberhalb von 10 mM) im Kristallisationspuffer (Kapitel 4.2.2) bzw. Enzymassaypuffer (Kapitel 5.3.3) eine deutliche Präzipitierung der Verbindungen beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde versucht, die Löslichkeit von 47 durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid zu 3,5-Di-(N-acetylamino)-phthalsäurehydrazid (52, Tab. 19) zu beeinflussen. Die Löslichkeit von 52 in DMSO liegt bei etwa 30 mM und nach Verdünnen mit Kristallisationspuffer kann eine Lösung mit 3 mM erhalten werden. Die Bindungsaffinität der zweifach acetylierten Verbindung 52 war mit K_i = 4,5 ± 1,6 μM etwa um den Faktor 20 schlechter als 47, sie lag aber in einem ähnlichen Bereich wie die von

4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**, $K_i = 8,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$). Die Strukturbestimmung von **52** in Komplex mit TGT erbrachte jedoch keine interpretierbare positive $|F_o - F_c|$ -Dichte.

5.4.3.2 Derivate von 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid

In einer weiteren Studie wurde untersucht, welchen Einfluß eine Erweiterung des aromatischen Ringsystems (Benzol- zu Naphthalingerüst) auf die Bindungseigenschaften nimmt. Die Synthese von 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid (**53**, Tab. 21) erfolgte wie in Kapitel 4.8.1 beschrieben. Das 8-(N-Acetylamino)-5-aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid (**55**) wurde aus Naphthalin-2,3-dicarbonsäure (**54**) in einer mehrstufigen Synthese erhalten (Abb. 32).

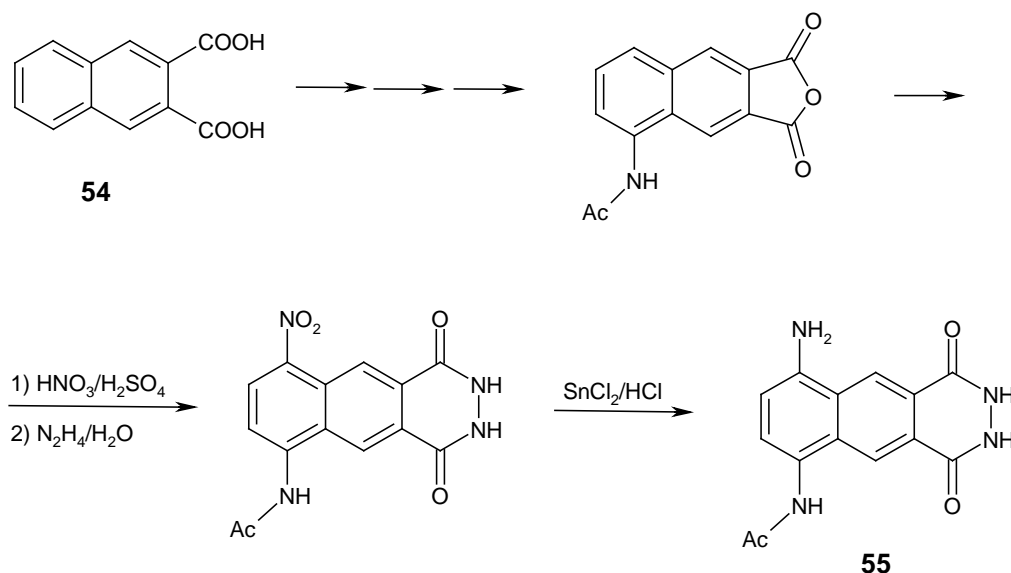


Abb. 32: Synthese von 8-(N-Acetylamino)-5-aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid (**55**) ausgehend von Naphthalin-2,3-dicarbonsäure (**54**). Die Darstellung des N-acetylierten Anhydrids erfolgte wie in Kapitel 4.8.1 beschrieben. Dann folgte eine weitere Nitrierung mit $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ und die direkte Umsetzung mit Hydrazinhydrat zum Hydrazid. Nach Reduktion mit Zinn(II)chlorid wurde das 8-(N-Acetyl-amino)-5-aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid (**55**) erhalten.

Die Bindungsaffinitäten der Verbindungen (**53** und **55**) wurden bestimmt (Kapitel 5.3.2.2) und anschließend durch „Soaking“ (Kapitel 4.2.2) der Bindungsmodus kristallographisch bestimmt (Tab. 21). Die Affinitäten von **53** und **55** lagen im unteren mikromolaren Bereich, wobei das einfach substituierte Derivat 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid (**53**) mit $K_i = 0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ die höchste Affinität zeigte.

Tab. 21: Soaking-Versuche der *Z. mobilis* TGT mit Derivate von 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid.

#	Verbindung	Struktur	K _i [μM]	Auflösung	Dichte
53	5-Aminonaphthalin-2,3dicarbonsäurehydrazid		0,3 ± 0,1	1,95 Å	☼ ^a
55	8-(N-Acetylamino)-5-aminonaphthalin-2,3dicarbonsäurehydrazid		9,3	1,95 Å	— ^a

^a Interpretierbare |F_o-F_c|-Differenzelektronendichte für das „gesoakte“ Molekül nach Verfeinerung des Datensatzes (—, nicht interpretierbar; ☼, interpretierbar)

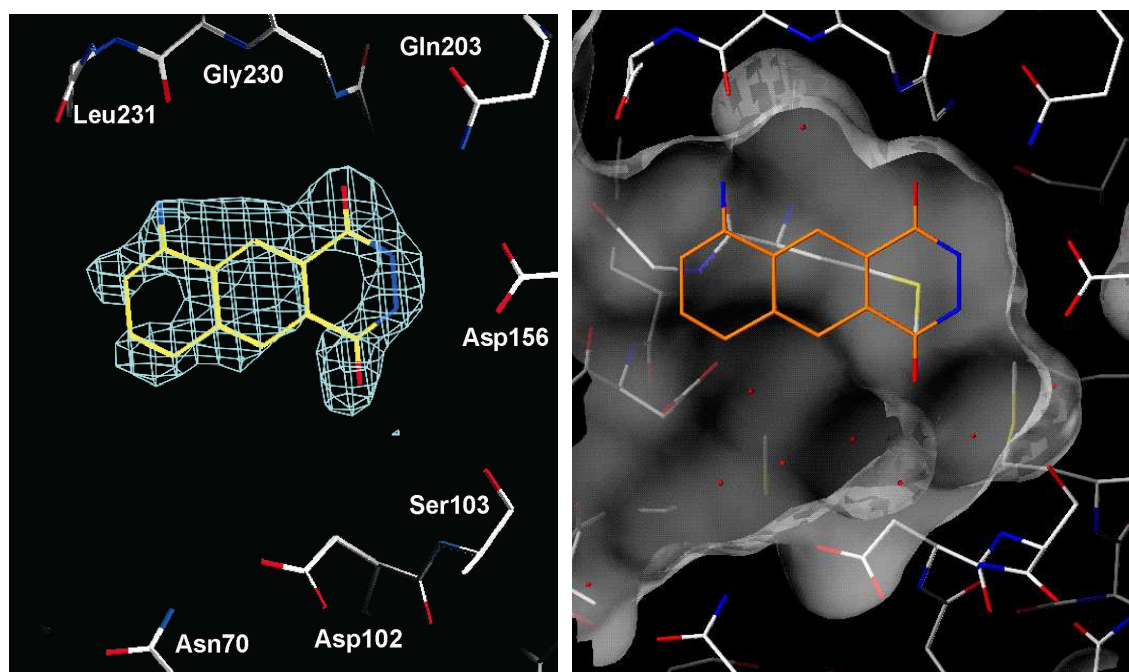


Abb. 33: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid (53) bei einer Auflösung von 1,95 Å. (a) Die 2F_o-F_c-Dichte von TGT-53 (hellblau, konturiert auf 1 σ) zeigt einige unterbrochene Bereiche für den Inhibitor, was vielleicht auf eine unvollständige Population von 53 in der Bindetasche zurückzuführen ist (links). (b) H-Brücken liegen zwischen folgenden Resten vor: Asp¹⁵⁶ und der NH-NH-Gruppe von 53 (2,8 Å bzw. 3,1 Å), der NH₂-Gruppe von Glu²⁰³ bzw. NH-Gruppe von Gly²³⁰ und der 2-Carbonylgruppe von 53 (2,6 Å bzw. 3,3 Å) und der Carbonylgruppe von Leu²³¹ und der 5-NH₂-Gruppe von 53 (2,5 Å) (links). (b) Darstellung der wasserzugänglichen Connolly-Oberfläche (Kapitel 5.4.1) im Bereich der Bindetasche (rechts)

Durch Einführung einer N-Acetylaminogruppe in 8-Position von **53** wurde die Affinität um den Faktor 30 reduziert (**55**, $K_i = 9,3 \mu\text{M}$). Die Röntgenstrukturanalyse der Verbindungen in Komplex mit TGT erbrachte nur für **53** eine interpretierbare positive $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte (Tab. 22).

Tab. 22: Datensammlung und Verfeinerung des Komplexes von *Z. mobilis* TGT mit 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid (53**).**

	TGT- 53
Raumgruppe	C2
Zellkonstanten	
a (Å)	90,74
b (Å)	64,98
c (Å)	71,02
β (deg)	96,74
Auflösungsbereich (Å)	35-1,95
Zahl der gemessenen Reflektionen	307.425
Zahl der unabhängigen Reflektionen	35.279
Vollständigkeit der Daten	100 (99,9)
(%, hoher Auflösungsbereich)	
R_{symm}^a für alle Daten	6,8 (23,1)
(%, hoher Auflösungsbereich)	
R_{free}^b (%)	23,4
R-Faktor ^b (%)	18,9
Zahl der Wassermoleküle	377
RMS-Abweichung, Winkel (deg)	1,354
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,006
^a $R_{\text{symm}} = \Sigma I - \langle I \rangle / \Sigma I$, wobei I die gemessene Intensität und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.	
^b Der R_{free} -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflektionen aus ~10% der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet.	

Die positive $|F_o - F_c|$ -Dichte von TGT-**53** zeigte nach dem ersten Verfeinerungszyklus eine diskontinuierliche Form, jedoch war die Orientierung der Phthalazin-1,4-dion-Funktionalität von **53** in Nachbarschaft zu Asp¹⁵⁶ erkennbar. Die Position der 5-Aminogruppe konnte nicht eindeutig in der positiven $|F_o - F_c|$ -Dichte erkannt werden, jedoch schien die Annahme einer

H-Brücke zu Leu²³¹ plausibel zu sein. In dieser postulierten Orientierung war zudem der Naphthalinring im größten Bereich der positiven $|F_o - F_c|$ -Dichte platziert. Nach dem zweiten Verfeinerungszyklus von TGT-**53** sind in der $2F_o - F_c$ -Differenzelektronendichte (konturiert auf 1σ) einige kleinere Einschnitte (Abb. 33 a) zu erkennen, was vielleicht aus einer unvollständigen Population von **53** in dieser Bindungsposition resultiert.

Das verfeinerte Strukturmodell zeigt H-Brücken zwischen folgenden Resten: Asp¹⁵⁶ und der NH-NH-Gruppe von **53** (2,8 Å bzw. 3,1 Å), der NH₂-Gruppe von Glu²⁰³ bzw. NH-Gruppe von Gly²³⁰ und der 2-Carbonylgruppe von **53** (2,6 Å bzw. 3,3 Å) und der Carbonylgruppe von Leu²³¹ und der 5-NH₂-Gruppe von **53** (2,5 Å).

5.4.3.3 Derivate von 3-Aminonaphthalin-1,8-dicarbonsäurehydrazid

Als ein alternatives Molekülgerüst bot sich die Synthese von 3-Aminonaphthalin-1,8-dicarbonsäurehydrazid (**57**) an, da die Ausgangsverbindung Naphthalin-1,8-dicarbonsäureanhydrid (**56**) kommerziell erhältlich ist. Die Synthese von **57** gelang durch Nitrierung der Ausgangsverbindung **56** unter moderaten Bedingungen (0 - 20°C, 2 h), anschließender Reduktion der Nitrogruppe mit Zinn(II)chlorid und Umsetzung mit Hydrazinhydrat zum Hydrazid (Abb. 34).

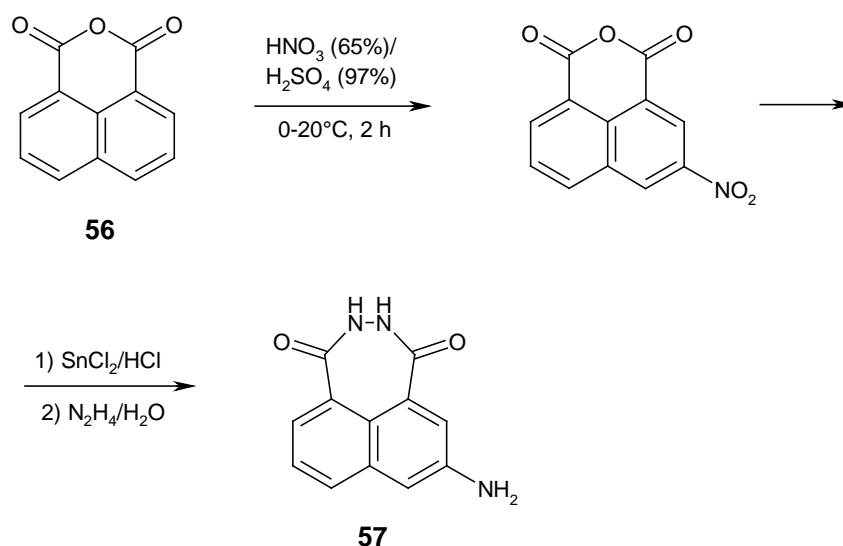
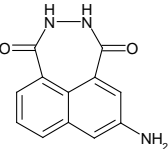
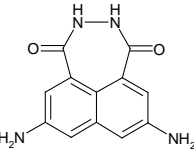


Abb. 34: Synthese von 3-Aminonaphthalin-1,8-dicarbonsäurehydrazid (**57**) ausgehend von Naphthalin-1,8-dicarbonsäureanhydrid (**56**). Im ersten Schritt erfolgte die Nitrierung des Anhydrids mit $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ zum 3-Nitronaphthalin-1,8-dicarbonsäureanhydrid (**56**). Durch Reduktion mit Zinn(II)chlorid und Umsetzung mit Hydrazinhydrat gelang die Darstellung des Hydrazids (**57**).

Durch Änderung der Reaktionsbedingungen (HNO_3 (100 %)/ H_2SO_4 (97 %); 0 - 55°C; 1,5 h) konnte **56** auch zweifach in 3,6-Position nitriert und anschließend analog das Hydrazid **58** erhalten werden (Hodgson & Ward, 1945). Die Verbindungen (**57** und **58**) wurden durch „Soaking“ (Kapitel 4.2.2) in Kristalle der *Z. mobilis* TGT und anschließender Strukturbestimmung charakterisiert (Tab. 23).

Tab. 23: Soaking-Versuche der *Z. mobilis* TGT mit Derivaten von 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid.

#	Verbindung	Struktur	K_i [μM]	Auflösung	Dichte
57	3-Aminonaphthalin-1,8-dicarbonsäurehydrazid		— ^a	1,8 Å	— ^b
58	3,6-Diaminonaphthalin-1,8-dicarbonsäurehydrazid		— ^a	1,9 Å	— ^b

^a Mögliche Inhibition wurde nicht untersucht.

^b Interpretierbare $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte für das „gesoakte“ Molekül nach Verfeinerung des Datensatzes (—, nicht interpretierbar; ☼, interpretierbar)

Für die untersuchten Verbindungen **57** und **58** ergab die kristallographische Verfeinerung keine interpretierbare positive $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte im Bereich der Bindetasche. Wie bereits bei einigen Guanin-Derivaten beobachtet (Kapitel 5.2), sind die Bindungsaffinitäten dieser Verbindungen möglicherweise zu niedrig, um eine Strukturbestimmung durchführen zu können. Diese Verbindungsklasse wurde daher nicht weiter untersucht.

5.5 Dritter Design-Zyklus

Nach den Erkenntnissen des zweiten Design-Zyklus (Kapitel 5.4) sollte die weitere Modifikation in 6-Position der Leitstruktur 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) erfolgen (Abb. 24). Ausgangspunkt sollte das bereits erwähnte 3,5-Dinitrophthalsäureimid (**45**, Abb. 28) sein, da eine etablierte Methode zur regioselektiven Einführung von Substituenten in die 3-Position von **45** bekannt war (Fischer & Kvita, 1985). In der zitierten Arbeit wurden Thiole als Nukleophile eingesetzt, so daß konsequenterweise zunächst Thiole in dem *Available Chemical Directory* (ACD) gesucht wurden. Darunter sollten diejenigen ausgewählt werden, die sowohl aus sterischen Gründen sowie aufgrund ihrer H-Donor-Eigenschaften die benachbarte Tasche von **24** optimal ausfüllen würden (Kapitel 5.4.1). Im nächsten Schritt sollten geeignete Thiol-Derivate von **24** mit dem Computer-Programm FlexX (Kapitel 4.5.2) in die Bindetasche gedockt und die beste Docking-Position mit der Scoring-Funktion DrugScore (Kapitel 4.6.2) bewertet werden. Aufgrund der Bindungsaffinitäten und der Qualität der Kristallstrukturen in Komplex mit der *Z. mobilis* TGT (Kapitel 5.4.3) sollten ausschließlich die Hydrazide in den weiteren Design-Zyklen untersucht werden.

5.5.1 Datenbanksuche nach Thiolen als Leitstruktur-Substituenten

Zur Suche nach Thiolen mit passenden Bindungseigenschaften in Nachbarschaft zu 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) wurde eine schrittweise Filterung der Daten im *Available Chemical Directory* (ACD) (MDL, 1997) angewendet. Die angestrebte Pharmakophor-Suche sollte gleichzeitig H-Donor-Eigenschaften der Thiole zu Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ berücksichtigen.

Im ersten Schritt wurde eine 2D-Suche mit dem Programm UNITY (UNITY, 2000) durchgeführt (Kapitel 4.7), wobei die ACD zunächst nach Thiolen durchsucht wurde, die an einem sp²- bzw. sp³-Kohlenstoffatom gebunden sind. Diese Konnektivität der Atome wurde durch Verwendung eines SLN-Codes (Kapitel 4.7) spezifiziert (Tab. 24).

Anhand der vorgegebenen 2D-Kriterien konnten 1651 Verbindungen aus insgesamt 183.564 Datenbank-Einträgen selektiert werden. Im nächsten Schritt wurden aus diesen Vorschlägen mit dem Programm SELECTOR (Kapitel 4.7) nur solche Verbindungen für die weitere Suche berücksichtigt, die ein bestimmtes Molekulargewicht unterschritten ($M_r < 400$ g/mol), sowie

mindestens einen Ring, aber kein Chiralitätszentrum enthielten (Tab. 25). Es verblieben nach diesem Schritt 1002 potentielle Treffer.

Tab. 24: Bei der 2D-Suche berücksichtigte terminale Thiole, die an einem sp^2 - bzw. sp^3 -Kohlenstoffatom gebunden sein sollten. Zur Spezifizierung in UNITY wurden die angegebenen SLN-Codes verwendet.

Funktionelle Gruppe	SLN
sp^3 -C-SH	CSH <v = 3>
sp^2 -C-SH	CSH <v = 2>

Tab. 25: Filterfunktion im Anschluß an die 2D-Suche mit dem Programm SELECTOR.

Filterkriterium	Wert
Molekulargewicht	< 400
Zahl der Ringe	1 – 10
Chiralitätszentren	0

Im nächsten Schritt erfolgte eine flexible Suche mit einem im Raum definierten Suchkriterium unter Verwendung eines atombasierten Pharmakophors aus drei Wasserstoffbrückendonoren und zwei hydrophoben Zentren (Abb. 35). Unter Verwendung der Kristallstruktur von TGT-24 wurden Pseudoatome mit den entsprechenden Eigenschaften in den gewünschten Positionen plziert (Abb. 35). Die Eigenschaften und Lage dieser Pseudoatome wurden wie folgt gewählt:

- Ein Wasserstoffbrückendonor-Atom (*Donor_Atom1*) im Bereich der 6-Position von 4-Aminophthalsäurehydrazid (Abb. 24, Kapitel 5.4.1). Idealerweise sollte hier die Thiolgruppe plziert werden.
- Ein Wasserstoffbrückendonor-Atom (*Donor_Atom2*) in der Nähe der Carboxylatgruppe von Asp²⁸⁰.
- Ein Wasserstoffbrückendonor-Atom (*Donor_Atom3*) in der Nähe der Carboxylatgruppe von Asp¹⁰² und der Carbonylgruppe von Asn⁷⁰.
- Jeweils ein hydrophobes Zentrum (*Hydrophobic1* und *Hydrophobic2*) zwischen den drei Donoren.

Die Toleranzgrenzen dieser Pseudoatom-Positionen wurden innerhalb bestimmter Grenzwerte eingestellt (Abb. 35 a). Die Suchbedingung wurde so gewählt, daß mögliche Treffer das *Donor_Atom1* enthalten mußten, da an dieser Stelle die SH-Gruppe zu plazieren war. Diese erfüllt formal gesehen das Wasserstoffbrückendonator-Kriterium. Dagegen mußten die Kriterien für *Donor_Atom2* bzw. *Donor_Atom3* und *Hydrophobic1* bzw. *Hydrophobic2* nur alternativ erfüllt sein. Dieses Kriterium wurde in der 3D-Suche berücksichtigt („Partial-Match“) und sollte Fragmente mit mindestens einem Donor in der Nähe von Asp¹⁰² oder Asp²⁸⁰ herausfiltern, die über eine hydrophobe „Brücke“ mit *Donor_Atom1* (idealerweise der SH-Gruppe) verbunden sind.

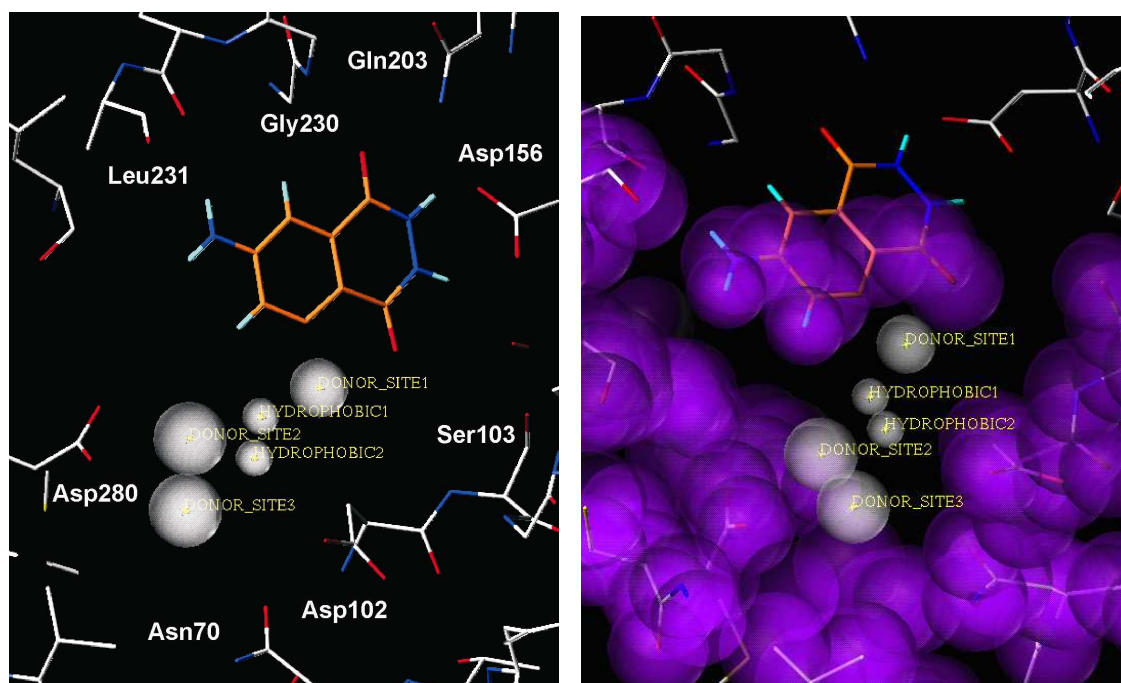


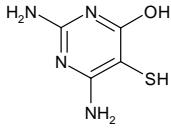
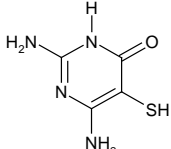
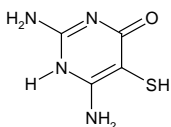
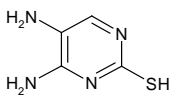
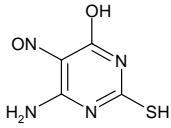
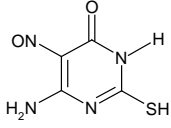
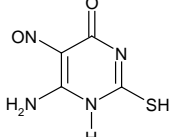
Abb. 35: Atombasierter Pharmakophor als 3D-Suchkriterium. (a) Mit dem Programm UNITY (Kapitel 4.7) wurden Pseudoatome unter Berücksichtigung der Kristallstruktur von TGT-**24** plaziert: *Donor_Atom1* (Radius 0,8 Å) neben der 3-NH₂-Gruppe von **24**; *Donor_Atom2* (Radius 1,0 Å) neben Asp²⁸⁰; *Donor_Atom3* (Radius 1,0 Å) neben Asp¹⁰² bzw. Asn⁷⁰; *HYDROPHOBIC1* und *HYDROPHOBIC2* (Radius jeweils 0,5 Å) zwischen den drei H-Donoren (links). (b) Zur abschließenden erweiterten 3D-Suche wurden „excluded volumes“ (Radius jeweils 1,0 Å) für alle Aminosäuren im Bereich der Bindetasche und das Fragment von **24** konstruiert.

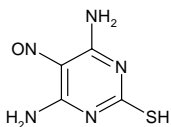
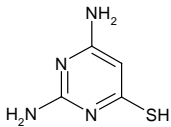
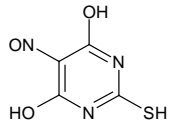
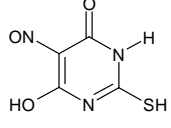
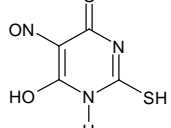
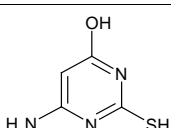
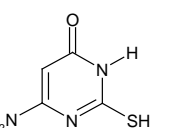
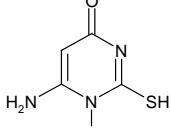
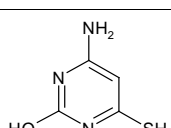
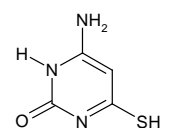
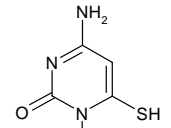
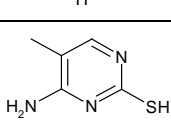
Dieses Kriterium wurde von 312 aus 1002 Verbindungen erfüllt. Im letzten Schritt wurden diese 312 Kandidaten nochmals einer erweiterten 3D-Suche unterworfen, die den Raumanspruch des Proteins bei der Plazierung der Moleküle mitberücksichtigte. Dazu wurden „excluded volumes“ für alle Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums konstruiert, d.h.

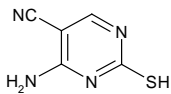
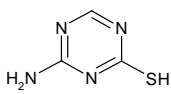
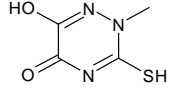
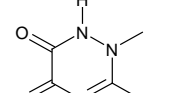
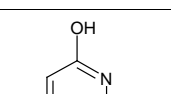
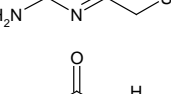
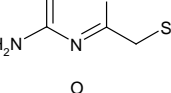
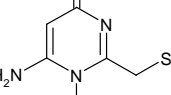
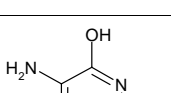
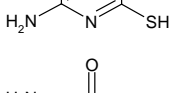
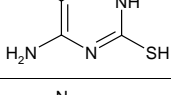
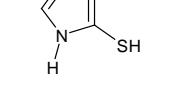
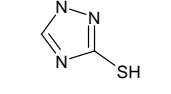
Bereiche, in denen die Bindung eines Liganden aufgrund sterischer Überlappung mit Proteinatomen ausgeschlossen werden sollte (Abb. 35).

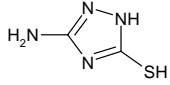
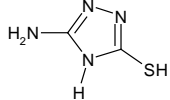
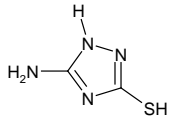
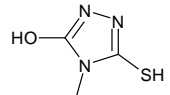
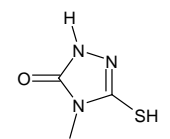
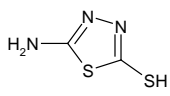
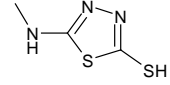
Das letzte Suchkriterium konnten 20 Thiole aus 312 Kandidaten erfüllen (Tab. 26), von denen 14 kommerziell erhältlich und damit sofort in der Synthese (Abb. 28) einsetzbar waren.

Tab. 25: Ergebnisse der flexiblen 3D-Suche nach Thiolen in dem *Available Chemical Directory* (ACD) mit dem Programm UNITY. Aus 183.564 Datenbank-Einträgen konnten 20 Thiole erhalten werden, die aus sterischen Gründen sowie aufgrund ihrer Donor-Funktionalität(en) in die polare Tasche passen würden. Von allen 20 Thiolen (in ihren denkbaren tautomeren Formen) wurden Derivate von 4-Aminophthalsäurehydrazid in der 6-Position erzeugt (Abb. 36, Kapitel 5.5.2). Diese wurden mit FlexX in die Bindetasche der TGT eingedockt (Kapitel 5.5.3). Die FlexX-Lösungen (FlexX-Rang) mit dem „korrekten“ Bindungsmodus wurden mit der Scoring-Funktion DrugScore bewertet und daraus eine Bindungskonstante (pK_i calc.) vorhergesagt (Kapitel 5.5.3).

#	Struktur	Vermerk	FlexX-Rang	DrugScore	pK_i (calc.)
59a			1	-177,91	6,73
59b			4	-179,1	6,78
59c			8	-176,47	6,68
60		Aldrich # 456330	1	-154,99	5,86
61a		Aldrich # S406422	47	-175,86	6,63
61b			1	-177,86	6,73
61c			3	-171,73	6,50

62		Aldrich # S417742	6	-162,79	6,16
63		Aldrich # 22384	65	-150,53	5,70
64a		Aldrich # S784001	26	-177,81	6,73
64b			12	-181,06	6,85
64c			4	-174,02	6,58
65a		Aldrich # A57406	1	-162,84	6,16
65b			1	-170,42	6,45
65c			2	-162,74	6,16
66a		Aldrich # S79060	11	-169,21	6,40
66b			6	-166,52	6,30
66c			15	-162,91	6,16
67		Beilstein # 1563790	5	-165,96	6,28

68		Aldrich # S379182	3	-163,43	6,18
69		Beilstein # 742388	2	-163,43	6,18
70a		Beilstein # 4178525	1	-172,58	6,53
70b			1	-174,05	6,58
71a			39	-180,88	6,84
71b			4	-179,10	6,78
71c			8	-176,47	6,68
72a		Aldrich # D17807	17	-171,41	6,48
72b			17	-168,06	6,36
73a		Fluka # 63870	2	-159,36	6,03
73b			31	-155,17	5,87
73c			32	-155,49	5,88
74		Aldrich # S982202	4	-163,81	6,20

75a		Fluka # 08383	2	-157,70	5,97
75b			1	-155,00	5,86
75c			1	-162,42	6,14
76a		Beilstein # 775572	4	-167,04	6,32
76b			1	-161,77	6,12
77		Fluka # 08380	6	-152,73	5,78
78		Aldrich # S655791	1	-166,46	6,30

5.5.2 Generierung von Thiol-Derivaten der Leitstruktur

Zunächst wurden mit SYBYL 3D-Strukturmodelle der in 6-Position substituierten Leitstruktur-Derivate erzeugt (Kapitel 4.4). Dazu wurden die Thiole aus Tab. 25 über das Schwefelatom mit dem 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) in 6-Position verknüpft (Abb. 36).

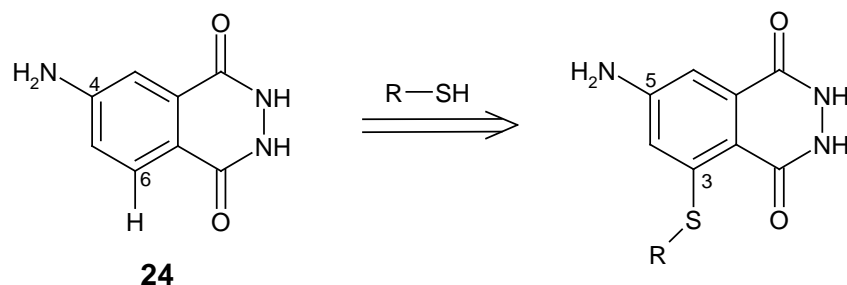


Abb. 36: Erzeugung von 3D-Strukturmodellen von Thiol-Derivaten der Leitstruktur. Die Verknüpfung der Thiole aus Tab. 25 erfolgte zwischen dem Schwefelatom und der 6-Position des 4-Aminophthalsäurehydrazids **24**. Durch Einführung eines Substituenten in **24** ändert sich die Numerierung und es werden 3,5-disubstituierte Derivate erhalten.

Wie in Tab. 25 gezeigt, sind einige Thiol-Derivate in mehreren tautomeren Formen denkbar. Die daraus resultierenden Unterschiede im Wasserstoffbrückenmuster können einen kritischen Einfluß auf die Wechselwirkungen zu den Aminosäureresten von Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ in der polaren Tasche (Kapitel 5.4.1) und damit auf die Bindungsaffinitäten haben. Die Lage des Gleichgewichts zwischen den einzelnen Tautomeren kann durch die Umgebung beeinflusst werden, z.B. durch das Lösungsmittel oder den Verhältnissen in der Proteinbindetasche. Daher wurden alle denkbaren Tautomere der entsprechenden Thiol-Derivate, unabhängig von der dominierenden Form in wäßriger Lösung, beim Docking mit FlexX berücksichtigt. Ein weiterer kritischer Punkt ist der Protonierungszustand der Thiol-Derivate, wobei protonierte und damit positiv geladene Reste in Nachbarschaft zu Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ einen günstigen Einfluß auf die Affinität haben sollten. Es ist allerdings bekannt, daß die pK_a-Werte von Liganden in der Bindetasche aufgrund veränderter lokaler Dielektrizitätskonstanten um mehrere pH-Einheiten verschoben sein können, vor allem wenn sich dabei geladene Gruppen gegenüberstehen (Bashford & Karplus, 1990). Die 3D-Strukturen wurden mit dem Tripos-Kraftfeld in SYBYL (SYBYL, 1999) minimiert (\rightarrow COMPUTE \rightarrow MINIMIZE), Gasteiger-Marsili-Ladungen (Gasteiger & Marsili, 1980) für alle Atome berechnet (\rightarrow COMPUTE \rightarrow CHARGES \rightarrow GASTEIGER) und im MOL2-Format ausgeschrieben.

5.5.3 Docking und Bewertung von Leitstruktur-Derivaten

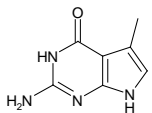
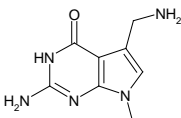
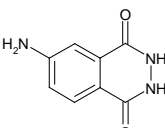
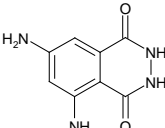
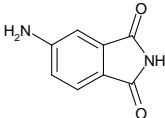
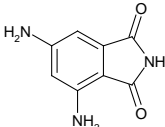
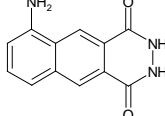
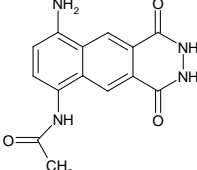
Die Thiol-Derivate von **24** (Tab. 25) wurden mit dem Computer-Programm FlexX (Kapitel 4.5.2) in die Bindetasche der *Z. mobilis* TGT eingedockt. Dazu wurde die Kristallstruktur der TGT in Komplex mit 4-Aminophthalsäurehydrazid (TGT·**24**, Kapitel 5.3.4) als Rezeptor für FlexX und **24** als Referenz-Ligand verwendet. Das Docking erfolgte mit Hilfe eines automatischen Skripts, das die in Kapitel 4.5.2 beschriebenen Schritte durchführte und für jeden Liganden 100 Docking-Positionen erzeugte. Für diese Lösungen wurden mit der in FlexX implementierten Scoring-Funktion (Kapitel 4.6.1) Rangfolgen erhalten (FlexX Rang, Tab. 26). Die FlexX-Lösungen wurden zusätzlich mit der Scoring-Funktion DrugScore (Kapitel 4.6.2) bewertet, wobei die Kristallstruktur von TGT·**24** (ohne Ligand und Wasser) als Rezeptor-Struktur diente (Tab. 25). Die Bindungsposition von **24** wurde als Referenz verwendet und mit den FlexX-Lösungen in Kombination mit den Bewertungen aus DrugScore (Tab. 25) verglichen. In den meisten Fällen wurden von FlexX Bindungspositionen vorhergesagt, in denen das 5-Aminophthalsäurehydrazid-Gerüst in einer

identischen Position wie in TGT-**24** plazierte wurde. Unter den FlexX-Lösungen mit einer solchen Bindungsposition wurden schließlich diejenigen mit dem höchsten DrugScore-Wert ausgewählt (Tab. 25).

Zur weiteren Beurteilung der gedockten Thiol-Derivate wurden DrugScore-Werte (exp.) für die kristallographischen Bindungspositionen der in den bisherigen Design-Zyklen charakterisierten TGT-Inhibitoren bestimmt (Tab. 26). Bei insgesamt fünf Verbindungen (**18**, **24**, **47**, **51**, **53**) stand sowohl die Kristallstruktur als auch ein K_i -Wert (pK_i exp.) in Bezug auf die *Z. mobilis* TGT zur Verfügung, für drei weitere Verbindungen (**12**, **48**, **55**) waren nur die Affinitäten bekannt (Tab. 26). Auf Grundlage des experimentellen Bindungsmodus einiger Verbindungen wurde mit DrugScore ein Scoringwert (calc.) berechnet. Alle Inhibitoren wurden anschließend mit FlexX (Kapitel 4.5.2) in die Bindetasche der TGT eingedockt. Nach Bewertung mit der in FlexX implementierten Scoring-Funktion wurden die Docking-Lösungen ausgeschrieben (#, FlexX-Rang). Die Bindungsposition des Liganden in der Kristallstruktur von TGT-**24** diente als Referenz zur Auswahl der besten Bindungsposition. Aus den 100 FlexX-Lösungen wurden dabei diejenigen ausgewählt, die eine möglichst gute Übereinstimmung mit der Referenz zeigten und eine hohe Bewertung von DrugScore erhielten.

Dabei stimmten die DrugScore-Werte für die fünf experimentellen und mit FlexX gedockten Bindungspositionen von **18**, **24**, **47**, **51** und **53** gut überein. Daher wurden die experimentellen Bindungsaffinität (pK_i exp.) aller Inhibitoren mit den DrugScore-Werten der FlexX-Lösungen (pK_i calc.) mit Hilfe einer achsenabschnittslosen linearen Regression korreliert (Abb. 37). Aufgrund einer zu hohen Abweichung (> 1 log-Einheit) des berechneten pK_i -Wertes (6,78) vom experimentellen pK_i -Wert (5,03) wurde die Verbindung **55** bei der Korrelation herausgelassen. Die Standardabweichung der Korrelation der übrigen 7 Verbindungen aus Tab. 26 betrug 0,64 log-Einheiten, der Korrelationskoeffizient r^2 lag bei 0,437. Mit DrugScore wurde ein Faktor von -0,0378 ermittelt (Kapitel 4.6.2), der zur Vorhersage der Bindungsaffinitäten (pK_i calc.) von Leitstruktur-Derivaten verwendet wurde. Dazu wurden im Folgenden die DrugScore-Werte der gedockten FlexX-Lösungen (Tab. 25) mit diesem Faktor multipliziert. Für die mit den 20 vorgeschlagenen Thiolen (Tab. 25) gebildeten Derivate der Leitstruktur berechneten sich Bindungskonstanten (pK_i calc.) im Bereich zwischen 5,70 (**63**) und 6,85 (**64b**). Die experimentelle Bindungskonstante der unsubstituierten Leitstruktur **24** lag bei 5,08 (Tab. 26). Auf Grundlage der pK_i (calc.)-Werte konnte daher für alle 20 Thiole eine Verbesserung der Bindungsaffinität erwartet werden konnte.

Tab. 26: Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT, für die in dieser Arbeit ein K_i -Wert bestimmt werden konnte. Auf Grundlage der experimentellen Kristallstruktur einiger Verbindungen (**18**, **24**, **47**, **51**, **53**) wurde mit DrugScore ein Scoringwert (exp.) berechnet. Alle Inhibitoren wurden anschließend mit FlexX (Kapitel 4.5.2) in die Bindetasche der TGT eingedockt (#, FlexX-Rang) und die Docking-Positionen mit DrugScore bewertet. Die DrugScore-Werte der fünf experimentellen und der mit FlexX gedockten Bindungspositionen von **18**, **24**, **47**, **51** und **53** stimmten gut überein. Daher wurden die experimentellen Bindungsaffinität (pK_i exp.) aller Inhibitoren mit den DrugScore-Werten der FlexX-Lösungen (pK_i calc.) korreliert (Abb. 37). In dieser Korrelation wurde der DrugScore-Wert von **55** ($pK_i = 6,17$) herausgelassen, da die Abweichung von den übrigen Werten zu hoch (> 1 log-Einheit) war.

#	Struktur	K_i [μ M]	pK_i (exp.)	DrugScore (exp.) ^a	DrugScore (FlexX) ^b	pK_i (calc.)
12		61	4,21	—	-103,58 (# 1)	4,85
18		5,1	5,29	-122,93	-116,02 (# 3)	5,76
24		$8,3 \pm 0,4$	5,08	-126,50	-118,06 (# 2)	5,93
47		$0,2 \pm 0,1$	6,70	-130,53	-122,78 (# 3)	6,12
48		$4,8 \pm 0,3$	5,32	—	-104,85 (# 2)	4,91
51		$2,1 \pm 1,4$	5,68	-102,91	-108,06 (# 2)	4,82
53		$0,3 \pm 0,1$	6,52	-140,19	-143,69 (# 3)	6,57
55		9,3	5,03	—	-163,33 (# 3)	(6,17)

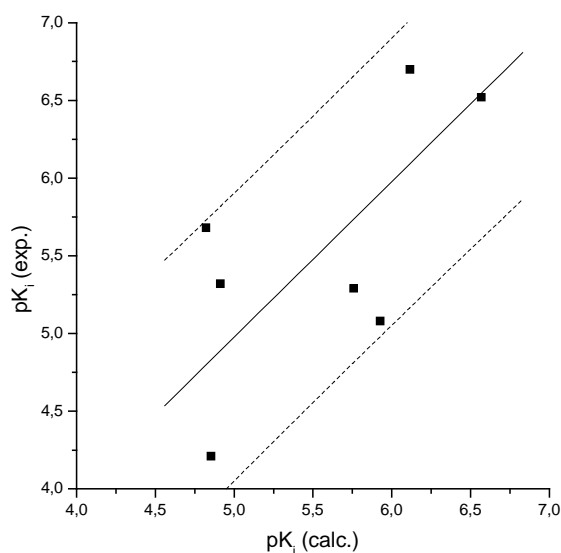
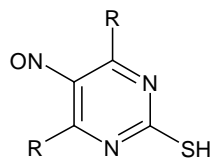
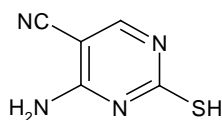


Abb. 37: Korrelation der experimentellen Bindungsaffinitäten (pK_i exp.) der Inhibitoren aus Tab. 26 mit den DrugScore-Werten der FlexX-Lösungen (pK_i calc.). Der berechnete pK_i -Wert für Verbindung **55** zeigte eine zu hohe Abweichung (> 1 log-Einheit) vom experimentellen pK_i -Wert und wurde daher bei der Korrelation herausgelassen. Die Standardabweichung der Korrelation der übrigen 7 Verbindungen aus Tab. 26 betrug 0,64 log-Einheiten, der Korrelationskoeffizient r^2 lag bei 0,437. Nach Kapitel 4.6.2 wurde ein Faktor von $-0,0378$ zur Umrechnung der DrugScore-Werte in pK_i (calc.) ermittelt.

Die Auswahl der Thiole für die Synthese der Leitstruktur-Derivate sollte allerdings nicht ausschließlich aufgrund der Docking-Ergebnisse mit FlexX und der berechneten DrugScore-Werte erfolgen. Es mußte zunächst auch die Frage geklärt werden, ob und unter welchen Bedingungen die Synthese der Thiol-Derivate erfolgreich sein könnte. Die Nitroso-Derivate **61**, **62** und **64**, sowie das Cyano-Derivat **68** erschienen ungeeignet für die Synthese, da mögliche Nebenreaktionen (an der NO- bzw. CN-Gruppe) bei der nachfolgenden Reduktion mit Zinn(II)chlorid und Salzsäure bzw. bei der Umsetzung mit Hydrazin nicht ausgeschlossen werden konnten. Diese Verbindungen wurden daher nicht weiter berücksichtigt.



61, 62, 64



68

Die Auswahl der Thiole sollte weiterhin zunächst auf kommerziell erhältliche Verbindungen beschränkt bleiben, womit die Liste auf 10 Kandidaten (jeweils fünf 5-Ring- und 6-Ring-

Thiole) reduziert wurde. An dieser Stelle sollte die Synthese sowohl 5-Ring- wie auch 6-Ring-Thiole einschließen, um einen Hinweis auf die optimale Ringgröße eines potentiellen Thiol-Substituenten in der polaren Tasche zu erhalten.

Aus den fünf 6-Ring-Thiolen wurden die Verbindungen **63** und **72** ausgewählt (Tab. 26), da in beiden Fällen ein günstiges Wechselwirkungsmuster zu Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ zu erwarten war (Abb. 37).

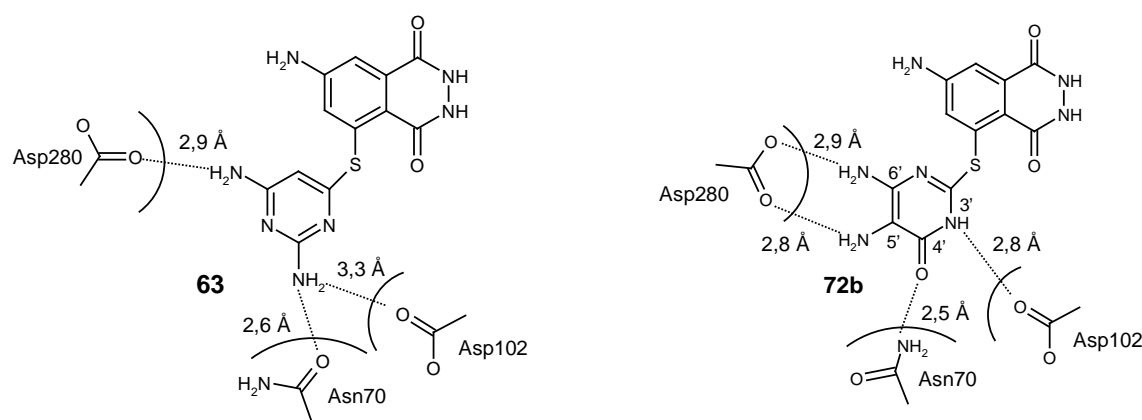


Abb. 38: Docking-Positionen von FlexX der beiden 6-Ring-Thiolderivate (63** und **72b**, Tab. 26) der Leitstruktur **24**.** In beiden Fällen zeigten die gedockten Lösungen H-Brücken in der polaren Tasche zu den Aminosäuren Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰. Die vorgeschagten Bindungsaffinitäten mit DrugScore (pK_i calc.) waren 5,70 (**63**) bzw. 6,36 (**72b**), der experimentelle pK_i-Wert der unsubstituierten Leitstruktur **24** lag bei 5,08 (Tab. 26).

Die gedockte Position von **64** (Abb. 38) zeigte H-Brücken zwischen den Aminogruppen und Asp¹⁰² (3,3 Å), Asn⁷⁰ (2,6 Å) und Asp²⁸⁰ (2,9 Å) und ergab mit DrugScore einen Scoringwert (pK_i calc.) von 5,70 (Tab. 26). Die Verbindung **72** in der tautomeren Form **72b** bildete H-Brücken zwischen der 3'-NH-Gruppe und Asp¹⁰² (2,8 Å), der 4'-Carbonylgruppe und Asn⁷⁰ (2,5 Å) und der 5'-NH₂-Gruppe (2,8 Å) bzw. 6'-NH₂-Gruppe (2,9 Å) und Asp²⁸⁰. Diese FlexX-Lösung ergab einen DrugScore-Wert (pK_i calc.) von 6,36 (Tab. 26). Als 5-Ring-Thiole wurden die Verbindungen **73a** und **75c** ausgewählt (Tab. 26), da in beiden Fällen H-Brücken des 1,2,4-Triazol-Rings zu Asp²⁸⁰ (Abb. 39) von FlexX vorgeschlagen wurden. Die N1'-H-Gruppe des 1H-1,2,4-Triazol-Ringes von **73a** zeigte Wechselwirkungen zu Asp²⁸⁰ (2,6 Å und 2,7 Å). Für **75c** wurden H-Brücken zwischen der N1'-H-Gruppe (2,7 Å) und der 5'-Aminogruppe (2,5 Å) des 5-Amino-1H-1,2,4-Triazol-Rings zu Asp²⁸⁰ gefunden. Die Bewertungen der FlexX-Lösungen mit DrugScore (**73a**: pK_i (calc.) = 6,03, FlexX-Rang 2; **75c**: pK_i (calc.) = 6,14, FlexX-Rang 1, Tab. 26) erschienen ebenfalls akzeptabel.

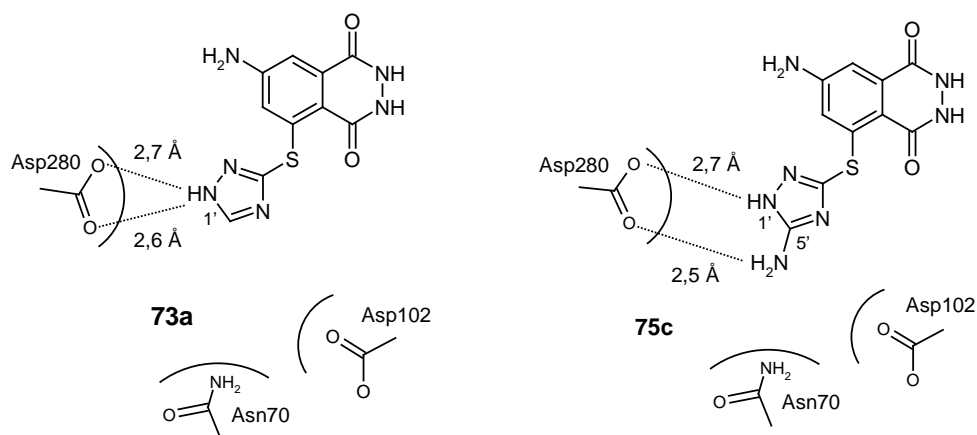
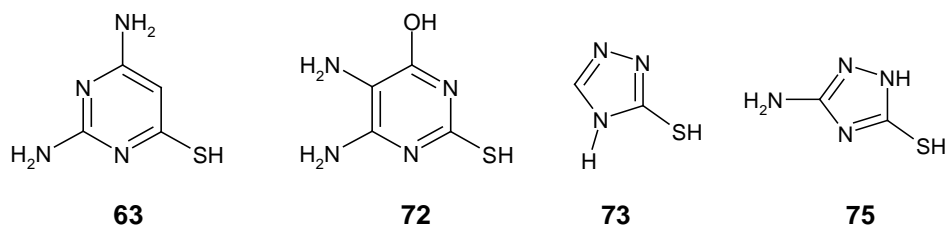


Abb. 39: Docking-Positionen von FlexX der beiden 5-Ring-Thiolderivate in den tautomeren Formen 73a und 75c (Tab. 26) der Leitstruktur 24. In beiden Fällen zeigten die gedockten Lösungen H-Brücken der NH-Donoren des 1,2,4-Triazols zu Asp²⁸⁰ in der polaren Tasche. Die vorgeschagten Bindungsaffinitäten mit DrugScore (pK_i calc.) waren 6,03 (**73a**) bzw. 6,14 (**75c**), der experimentelle pK_i-Wert der unsubstituierten Leitstruktur **24** lag bei 5,08 (Tab. 26).

5.5.4 Bindungseigenschaften von Thiol-Derivaten der Leitstruktur

Aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 5.5.3 wurden folgende Thiole aus Tab. 26 für die Synthese der Leitstruktur-Derivate nach der in Abb. 28 (Kapitel 5.4.2) beschriebenen Methode (Fischer & Kvita, 1985) ausgewählt:



Mit den 6-Ring-Thiolen **63** und **72** konnten nach der beschriebenen Synthesemethode bisher die gewünschten Produkte nicht erhalten werden, was vielleicht teilweise auf die geringe Löslichkeit der Verbindungen in dem Reaktionsmedium zurückzuführen war (H.-D. Gerber, persönl. Mitteilung). Die Umsetzung mit den 5-Ring-Thiolen **73** und **75** gelang dagegen mit Erfolg und die in 3-Position substituierten 5-Nitrophthalsäureimide konnten wie in Kapitel 5.4.3 beschrieben in zwei Stufen zu den entsprechenden 5-Aminophthalsäurehydraziden umgesetzt werden (Abb. 40).

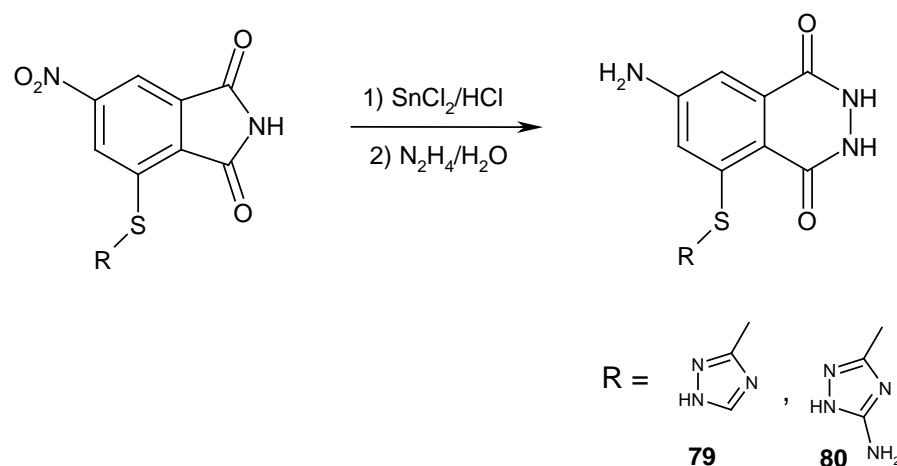


Abb. 40: Weitere Modifikationen der in 3-Position substituierten 5-Nitrophthalsäureimide in die entsprechenden 5-Aminophthalsäurehydrazide. Die Reduktion der Nitro-Gruppe erfolgte mit Zinn(II)chlorid und die Umsetzung zum Hydrazid gelang mit Hydrazinhydrat.

Die Bindungsaffinitäten der synthetisierten Verbindungen 5-Amino-3-(1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid (**79**) und 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid (**80**) wurden bestimmt (Kapitel 5.3.2.2) und anschließend durch „Soaking“ (Kapitel 4.2.2) der Bindungsmodus kristallographisch bestimmt (Tab. 28).

Tab. 28: Soaking-Versuche der *Z. mobilis* TGT mit Thiol-Derivaten von 4-Aminophthalsäurehydrazid.

#	Verbindung	Struktur	K_i [μM]	Auflösung	Dichte
79	5-Amino-3-(1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid		54 ± 14	2,1 Å	☼ ^a
80	5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid		38 ± 1	1,4 Å	☼ ^a

^a Interpretierbare $[\text{F}_o - \text{F}_c]$ -Differenzelektronendichte für das „gesoakte“ Molekül nach Verfeinerung des Datensatzes (—, nicht interpretierbar; ☼^a, interpretierbar)

Die Bindungskonstanten von **79** und **80** lagen im mikromolaren Bereich, jedoch resultierte in beiden Fällen die Einführung des Thiol-Restes in 6-Position des 4-Aminophthalsäurehydrazids (**24**, $K_i = 8,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$) in einer Abnahme der Affinität um den Faktor 6,5 (**79**, $K_i = 54 \pm 14 \mu\text{M}$) bzw. um den Faktor 4,5 (**80**, $K_i = 38 \pm 1 \mu\text{M}$).

Die positive $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte der Strukturmodelle von TGT-**79** und TGT-**80** (Tab. 29) zeigte jeweils nach der ersten Verfeinerung eindeutig die Position des 5-Aminophthalsäurehydrazid-Fragmentes in der Bindetasche (Abb. 41 und 42). Die Position von **79** konnte anhand der positiven $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte in der Bindetasche identifiziert werden. Zunächst wurde das 5-Aminophthalsäurehydrazid-Fragment in der $|F_o - F_c|$ -Dichte platziert. Anschließend wurde die Ausrichtung des 1,2,4-Triazol-Restes so gewählt, daß eine optimale Position in der positiven $|F_o - F_c|$ -Dichte sowie H-Brücken-Kontakte der N-Atome zu den Carboxylat-Sauerstoffatomen von Asp¹⁰² und Asp²⁸⁰ erreicht wurden.

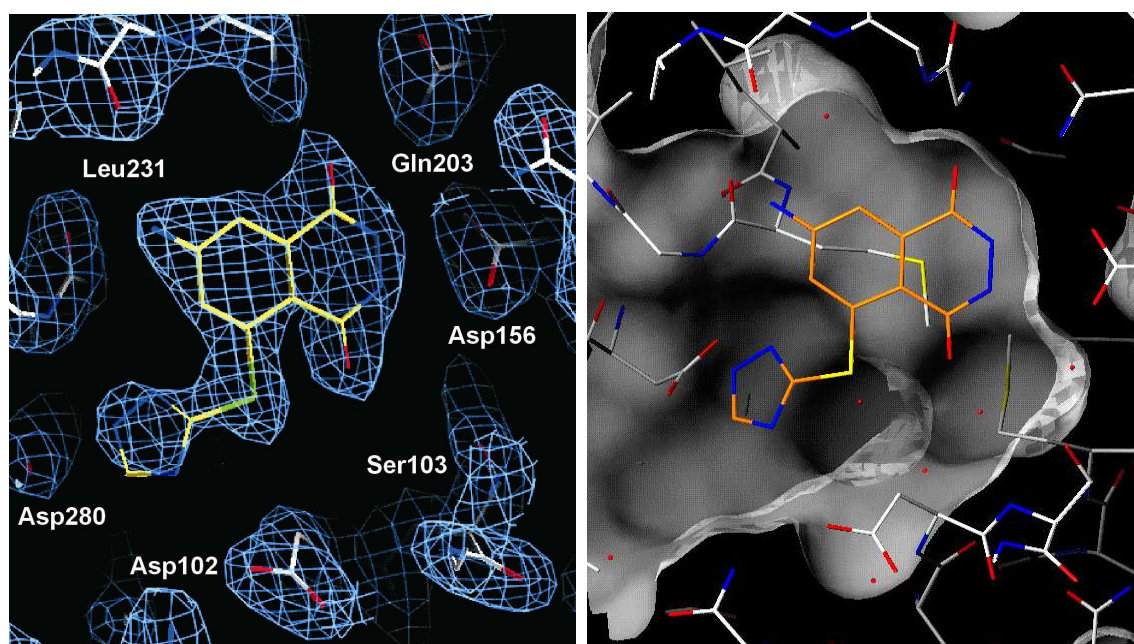


Abb. 41: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit 5-Amino-3-(1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid (**79**) bei einer Auflösung von 2,1 Å. (a) Die $2F_o - F_c$ -Differenzelektronendichte (hellblau, konturiert auf 1 σ) des verfeinerten Strukturmodells zeigt eindeutig die Bindungsposition des Inhibitors (links). Eine schwache H-Brücke wird zwischen der 5-NH₂-Gruppe von **79** und Leu²³¹ (3,2 Å) gefunden, das N1'- bzw. N4'-Stickstoffatom des 1,2,4-Triazol-Substituenten liegt in H-Brücken-Distanz (2,7 Å bzw. 3,2 Å) zu Asp¹⁰² und Asp²⁸⁰ (rechts). (b) Darstellung der wasserzugänglichen Connolly-Oberfläche (Kapitel 5.4.1) im Bereich der Bindetasche (rechts).

Im verfeinerten Strukturmodell des TGT·**79**-Komplexes befindet sich das N1'- bzw. N4'-Stickstoffatom des 1,2,4-Triazol-Substituenten in H-Brücken-Distanz zu Asp¹⁰² (3,4 Å) und Asp²⁸⁰ (2,7 Å bzw. 3,3 Å) (Abb. 41). Eine schwache H-Brücke liegt zwischen der 5-NH₂-Gruppe von **79** und Leu²³¹ (3,4 Å) vor.

Für die Verbindung 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid (**80**) in Komplex mit *Z. mobilis* TGT konnte am „Deutschen Elektronen Synchrotron“ in Hamburg (DESY) ein Datensatz mit einer Auflösung bis 1,4 Å vermessen werden (Tab. 29). Die Verfeinerung des Datensatzes erfolgte mit dem Programm SHELX (Kapitel 4.2.4), wobei die Struktur von TGT·**24** (Kapitel 5.3.4) als Startmodell diente (ohne Ligand). SHELX bietet zusätzliche Optionen zur Verfeinerung hochaufgelöster Proteinstrukturen, z.B. die Möglichkeit einer anisotropen Verfeinerung aller Atome oder die Berücksichtigung alternativer Konformationen mit reduzierter Besetzung in ungeordneten Bereichen des Proteins. Die PDB-Datei des Startmodells wurde mit dem Hilfsprogramm SHELXPRO zunächst in ein für SHELX lesbares Format (.ins) konvertiert und das Modell in mehreren Zyklen mit dem Programm SHELXL verfeinert. Der Einbau zusätzlicher Wassermoleküle erfolgte mit dem Programm ARP (Kapitel 4.2.4), wobei ein Korrekturterm („diffuse solvent parameter“, SWAT) für die Wassermoleküle eingeführt wurde.

Nach dem ersten Verfeinerungszyklus zeigte die positive $|F_o - F_c|$ -Dichte einen diskontinuierlichen Verlauf im Bereich der potentiellen Bindungsstelle von **80** (Abb. 42 a). Das 5-Aminophthalsäurehydrazid-Basisfragment konnte analog zu TGT·**79** in der positiven $|F_o - F_c|$ -Dichte platziert werden, jedoch war eine eindeutige Ausrichtung des 5-Amino-1,2,4-Triazol-Restes aufgrund der zerissenen Form der $|F_o - F_c|$ -Dichte in diesem Bereich nicht möglich. Daher wurden die Populationsparameter der Atome des Triazol-Substituenten im anschließenden Zyklus auf 0 gesetzt und alle Atome anisotrop verfeinert (ANIS). Das verfeinerte Strukturmodell von TGT·**80** (R-Faktor 14,2 %) zeigt eine definierte $2F_o - F_c$ -Differenzelektronendichte für das 5-Amino-3-thiol-phthalsäurehydrazid-Fragment (Abb. 42 b). Die Bindungsposition des 5-Amino-1,2,4-Triazol-Ringes kann jedoch weiterhin nicht anhand der positiven $|F_o - F_c|$ -Dichte identifiziert werden. Die schlecht definierte $|F_o - F_c|$ -Dichte deutet auf eine Fehlordnung des 5-Amino-1,2,4-Triazol-Restes im Bereich der polaren Tasche hin, möglicherweise aufgrund mehrerer alternativer Wechselwirkungsmuster zu den Aminosäuren Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰.

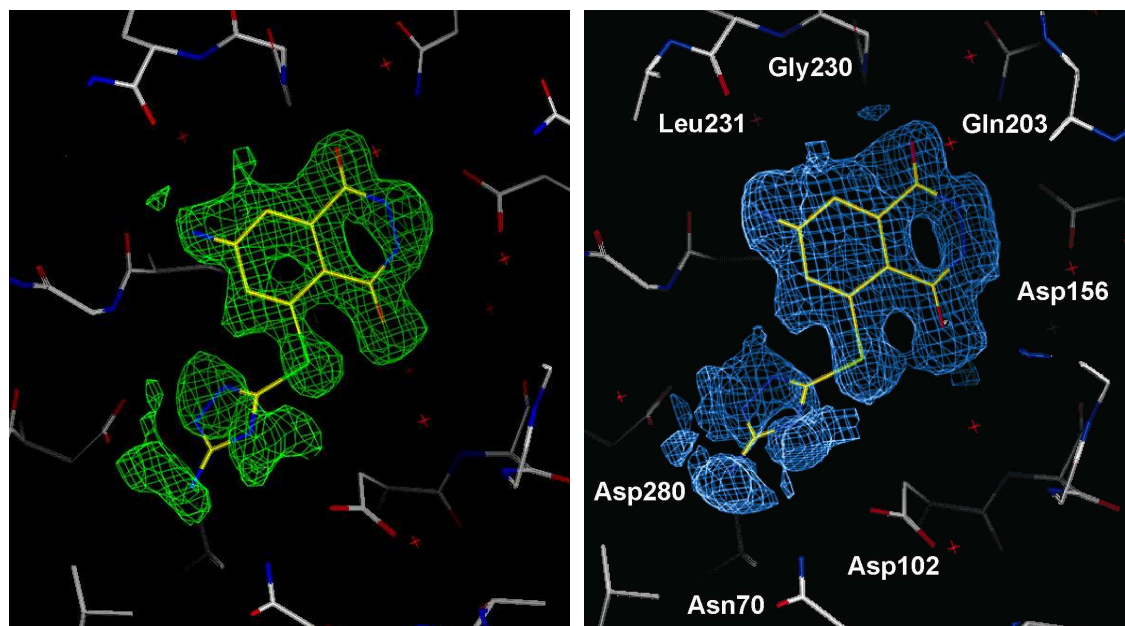


Abb. 42: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid (**80**) bei einer Auflösung von 1,4 Å. (a) Die positive $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte (grün, konturiert auf 2,2 σ) nach dem ersten Verfeinerungszyklus zeigte eindeutig die Anwesenheit des Inhibitors in der Bindetasche (links). (b) Nach Platzierung von **80** in der positiven $|F_o - F_c|$ -Dichte und anschließender Verfeinerung zeigt die $2F_o - F_c$ -Differenzelektronendichte (hellblau, konturiert auf 1 σ) einen diskontinuierlichen Verlauf im Bereich des 5-Amino-1,2,4-Triazol-Rings (rechts). Dies deutet auf eine Fehlordnung des 5-Amino-1,2,4-Triazol-Restes im Bereich der polaren Tasche hin, möglicherweise aufgrund von alternativen Wechselwirkungsmustern zu den Aminosäuren Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰. Eine schwache H-Brücke wird zwischen der 5-NH₂-Gruppe von **80** und Leu²³¹ (3,4 Å) gefunden.

Ausgehend von der verfeinerten Struktur von TGT-**80** wurden daher mit dem Programm SYBYL zwei mögliche Orientierungen des 5-Amino-1,2,4-Triazol-Ringes modelliert (Abb. 43). Dabei wurde angenommen, daß **80** am Triazol-Ring nicht protoniert vorliegt und zwei Tautomere (gemäß den Formen **75a-c**, Tab. 25, Kapitel 5.5.1) des Triazols an der Bindung beteiligt sind. In der einen Konformation (weiß) befindet sich der N2'-Stickstoff und ein Carboxylatsauerstoff von Asp¹⁰² (2,8 Å) bzw. die 5'-NH₂-Gruppe von **80** und ein Carboxylatsauerstoff von Asp²⁸⁰ (2,7 Å) auf H-Brücken-Distanz. Dieses Wechselwirkungsmuster würde voraussetzen, daß **80** am N2'-Stickstoff protoniert vorliegt. Die H-Brücke zwischen dem N2'-Stickstoff und dem Carboxylatsauerstoff von Asp¹⁰² in dieser Konformation (weiß) würde eine repulsive Wechselwirkung zwischen dem nichtprotonierten N1'-Stickstoff und dem Carbonylsauerstoff von Asn⁷⁰ (3,3 Å) bedingen. Die andere mögliche Orientierung (orange) zeigt H-Brücken zwischen dem N1'-Stickstoff (2,8 Å) und einem Carboxylatsauerstoff von Asp²⁸⁰ bzw. der 5'-NH₂-Gruppe und dem Carbonylsauerstoff von

Asn⁷⁰ (3,3 Å). Dagegen müßten der N4'-Stickstoff und ein Carboxylatsauerstoff von Asp¹⁰² einen repulsiven Kontakt eingehen. Neben den beschriebenen attraktiven Wechselwirkungen aufgrund von H-Brücken sind damit in beiden Orientierungen auch repulsive Kontakte zwischen gegenüberliegenden Akzeptor-Gruppen denkbar (Abb. 43).

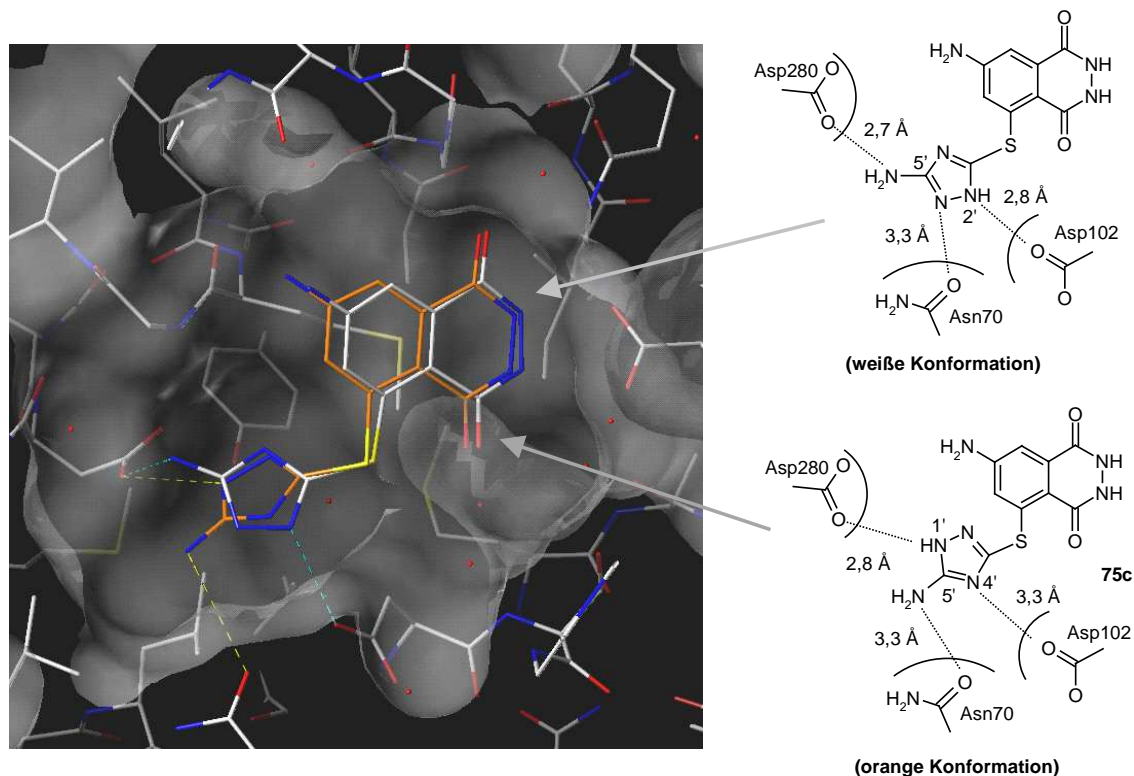


Abb. 43: Mögliche Orientierungen des 5-Amino-1,2,4-Triazol-Restes 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4] triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid (**80**) in der Bindetasche der *Z. mobilis* TGT. In der einen Konformation (weiß) befinden sich der N2'-Stickstoff und ein Carboxylatsauerstoff von Asp¹⁰² (2,8 Å) bzw. die 5'-NH₂-Gruppe von **80** und ein Carboxylatsauerstoff von Asp²⁸⁰ (2,7 Å) auf H-Brücken-Distanz. Repulsive Wechselwirkungen würden zwischen dem N1'-Stickstoff und dem Carbonylsauerstoff von Asn⁷⁰ (3,3 Å) vorliegen. Die andere mögliche Orientierung (orange) zeigt H-Brücken zwischen dem N1'-Stickstoff und einem Carboxylatsauerstoff von Asp²⁸⁰ (2,8 Å) bzw. der 5'-NH₂-Gruppe und dem Carbonylsauerstoff von Asn⁷⁰ (3,3 Å). Eine repulsive Wechselwirkung liegt zwischen dem N4'-Stickstoff und einem Carboxylatsauerstoff von Asp¹⁰² (3,3 Å) vor.

In beiden Fällen wurde vorausgesetzt, daß der 5-Amino-1,2,4-triazol-Rest von **80** neutral vorliegt. Eine genaue Diskussion der Bindungsverhältnisse von **80** setzt damit die Kenntnis des Protonierungszustandes sowie der wahrscheinlichsten tautomeren Form voraus (Kapitel 5.5.5).

Die Annahme alternativer Konformationen des 5-Amino-1,2,4-triazol-Substituenten aufgrund möglicher repulsiver Wechselwirkungen steht im Einklang mit der beobachteten Unordnung in der Kristallstruktur von TGT·**80**. Dies würde auch die reduzierte Affinität von **80** ($K_i = 38 \pm 1 \mu\text{M}$) im Vergleich mit der unsubstituierten Verbindung **24** ($K_i = 8,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$)

erklären. Eine Überlagerung aller Hauptkettenatome („C α -fit“) der Kristallstrukturen von TGT-**24**, TGT-**47**, TGT-**53**, TGT-**79** und TGT-**80** zeigt eine signifikante Verschiebung des 5-Aminophthalsäurehydrazid-Gerüsts (Abb. 44). Die Einführung eines Triazol-Restes in **24** bzw. **47** resultiert in einer Aufweitung der H-Brücke zwischen der 5-NH₂-Gruppe und Leu²³¹ in der Reihe TGT-**24** (2,8 Å), TGT-**47** (2,8 Å), TGT-**79** (3,2 Å) und TGT-**80** (3,4 Å). Die Schwächung dieser H-Brücke könnte ein weiterer Grund für die reduzierten Affinitäten von **79** und **80** (K_i = 54 μ M bzw. 38 μ M) im Vergleich zu **24** und **47** (K_i = 8,3 μ M bzw. 0,2 μ M) sein. In der Kristallstruktur TGT-**53** liegen dagegen günstige Kontakte zwischen der 5-NH₂-Gruppe und Leu²³¹ (2,5 Å) vor, was analog die höhere Affinität dieser Verbindung (K_i = 0,3 \pm 0,1 μ M) erklären könnte.

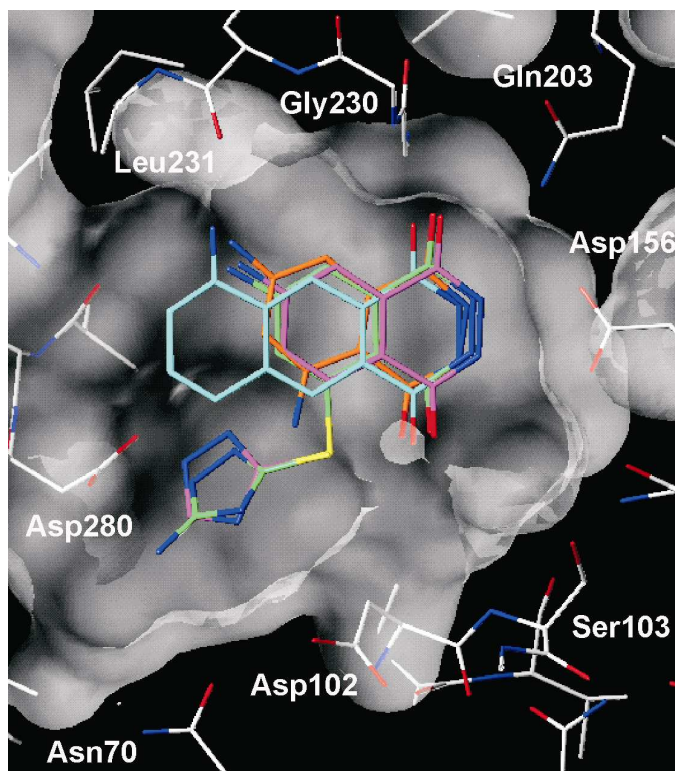


Abb. 44: Die Überlagerung der Komplexe von TGT-**47** (orange), TGT-**53** (blau), TGT-**79** (magenta) und TGT-**80** (grün) zeigt eine signifikante Verschiebung des 5-Aminophthalsäurehydrazid-Gerüsts. Die Einführung eines Triazol-Restes in die 6-Position von 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**, Abb. 28, Kapitel 5.4.2) resultiert in einer Schwächung der H-Brücke zwischen der 5-NH₂-Gruppe und Leu²³¹ in der Reihe TGT-**47** (2,8 Å), TGT-**79** (3,2 Å) und TGT-**80** (3,4 Å). In der Kristallstruktur TGT-**53** sind dagegen günstige Kontakte zwischen der 5-NH₂-Gruppe und Leu²³¹ (2,5 Å) zu finden, was auch die höhere Affinität dieser Verbindung (K_i = 0,3 \pm 0,1 μ M) erklären könnte.

Tab. 29: Datensammlung und Verfeinerung der Komplexe von *Z. mobilis* TGT und 5-Amino-3-(1H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-phthalsäurehydrazid (79), 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid (80).

	TGT·79	TGT·80 ^c
Raumgruppe	C2	C2
Zellkonstanten		
a (Å)	90,69	90,22
b (Å)	64,89	64,73
c (Å)	71,49	70,49
β (deg)	96,97	95,91
Auflösungsbereich (Å)	40-2,1	35-1,4
Zahl der gemessenen Reflektionen	254.203	936.719
Zahl der unabhängigen Reflektionen	24.171	78.085
Vollständigkeit der Daten	98,0 (98,4)	98,4 (97,5)
(%, hoher Auflösungsbereich)		
R _{symm} ^a für alle Daten	8,5 (29,5)	4,8 (16,4)
(%, hoher Auflösungsbereich)		
R _{free} ^b (%)	23,7	-
R-Faktor ^b (%)	20,3	14,2 ^c
Zahl der Wassermoleküle	369	473
RMS-Abweichung, Winkel (deg)	1,450	1,384
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,007	0,006

^a $R_{\text{symm}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, wobei I die gemessene Intensität und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.

^b Der R_{free}-Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflektionen aus ~10% der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet.

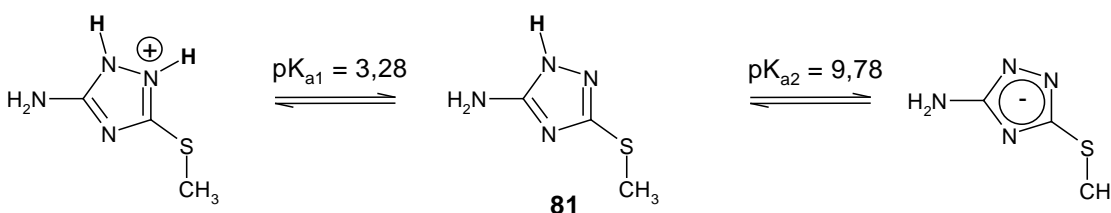
^c Die Daten wurden am „Deutschen Elektronen Synchrotron“ (DESY) in Hamburg gesammelt und mit dem Programm SHELX (Kapitel 4.2.4) verfeinert. Die Detektion der Intensitäten erfolgte elektronisch (MAR CCD Image Plate) an der „MPG/GBF wiggler beamline BW6/DORIS“. Der Kristall-Detektor-Abstand betrug 60 mm. Zur Aufnahme des Beugungsbildes wurde der Kristall für 10 sec mit dem Primärstrahl bestrahlt und dabei um 0,25° gedreht. Die Datenreduktion erfolgte wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben.

5.5.5 Struktur und Protonierungszustand von Thiol-Derivaten der Leitstruktur

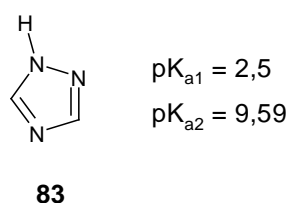
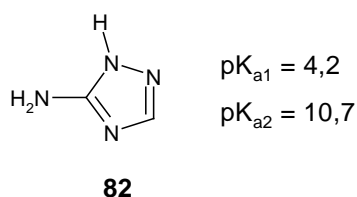
5.5.5.1 pK_a-Wertbestimmungen

Zur Beurteilung des Protonierungszustandes der Leitstruktur-Derivate **79** und **80** wurde eine potentiometrische pK_a-Wertbestimmung (Kapitel 4.9) durchgeführt. Allerdings waren beide Verbindungen sowohl in Wasser als auch in Dioxan bzw. in einer Wasser-Dioxan-Mischung sehr schlecht löslich und eine Messung somit nicht möglich. Daher wurde das S-Methyl-Derivat **81** als Modellverbindung mit ausreichender Löslichkeit untersucht.

Für 5-Amino-3-methylmercapto-1H-[1,2,4]triazol (**81**) (Sigma) wurden durch potentiometrische Titrations (pH 12,4 → 1,4) zwei pK_a-Werte (3,28 und 9,78) gefunden, die sich wie folgt zuordnen ließen:



Der pK_{a1}-Wert der ersten Stufe (protoniert/neutral) stimmte gut mit der Literaturangabe (pK_a = 3,27) für **81** aus einer früheren Studie überein (Gabryszewski, 1992). Für das unsubstituierte 5-Amino-1,2,4-Triazol **82** wurden ebenfalls zwei pK_a-Werte (4,2 und 10,7) angegeben (Chamberlain *et al.*, 1996). In saurer Lösung (pH < 3,28) ist **81** somit protoniert, in alkalischer Lösung (pH > 9,78) deprotoniert. Daher liegt das 5-Amino-1,2,4-Triazol-Derivat **80** in der Puffer-Lösung (pH-Wert 8,5), die zum „Soaking“ (Kapitel 4.2.2) und für den Enzymassay (Kapitel 4.1.8.2) verwendet wurde, wahrscheinlich neutral vor.



Für das unsubstituierte 1,2,4-Triazol **83** werden in der Literatur (Perrin, 1965) zwei pK_a-Werte (2,5 und 9,59) angegeben, so daß auch hier die neutrale Form von **79** bei pH 8,5 angenommen werden kann.

5.5.5.2 Struktur von 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid

Zur weiteren Aufklärung des Protonierungszustands und der stabilsten tautomeren Form wurde die Struktur von 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid (**80**) bestimmt. Die Kristallisation gelang bei den gleichen Puffer-Bedingungen (pH-Wert 8,5), die auch zum „Soaking“ (Kapitel 4.2.2) der Verbindung in Kristalle der *Z. mobilis* TGT verwendet wurden (Kapitel 4.3.1). Die Datenmessung (Kapitel 4.3.2) erfolgte unter kryogenen Bedingungen (-140°C) auf einem Vierkreis-Diffraktometer mit CCD-Flächendetektor an der Universität Göttingen (AG Sheldrick). Zur Strukturlösung wurde das Programm SHELXS (Kapitel 4.3.3) verwendet (Tab. 30).

Das 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid kristallisiert in der monoklinen Raumgruppe C2/c und enthält vier Wassermoleküle in der asymmetrischen Einheit (Abb. 45).

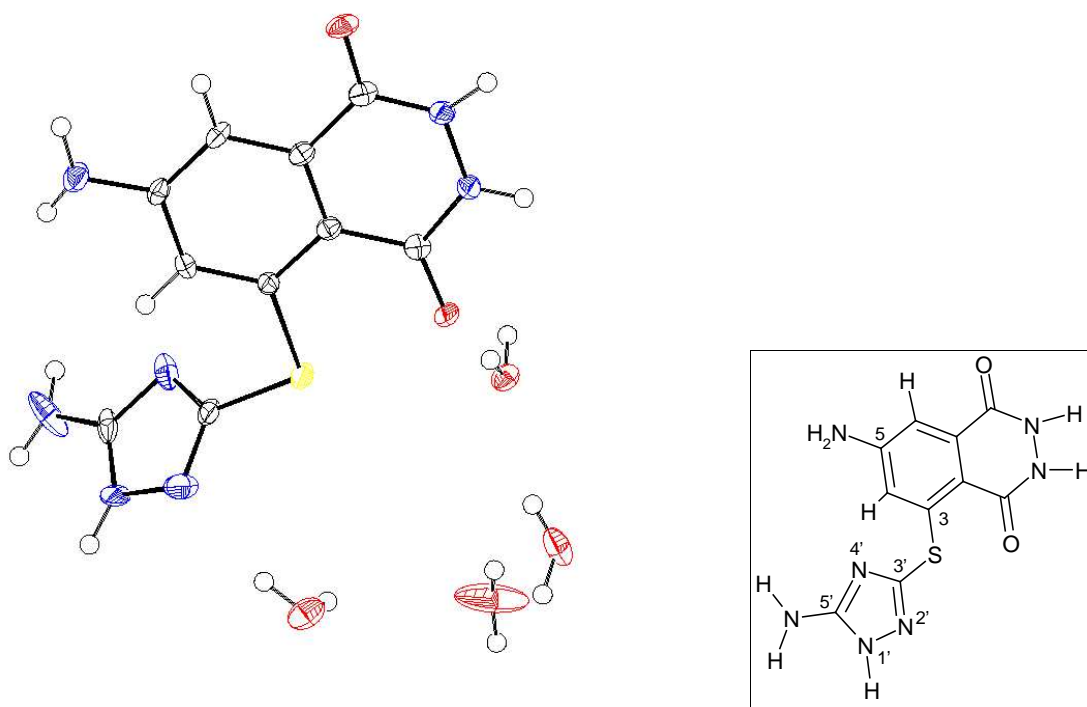


Abb. 45: Struktur von 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid (80**).** Die Verbindung wurde aus wäßriger Lösung (pH-Wert 8,5) kristallisiert und es wurden Kristalle der monoklinen Raumgruppe C2/c erhalten. Die asymmetrische Einheit enthält vier Wassermoleküle. In der verfeinerte Struktur von **80** sind insgesamt neun Wasserstoffatome enthalten, eines davon am N1'-Stickstoffatom des 5-Amino-1,2,4-Triazol-Rings. Die Analyse der Bindungslängen ermöglicht eine Zuordnung der Doppelbindungen. Die Struktur zeigt, daß **80** in wäßriger Lösung (pH-Wert 8,5) neutral ist. Die tautomere Form mit einem Proton am N1'-Stickstoffatom ist unter diesen Bedingungen wahrscheinlich bevorzugt.

Die verfeinerte Struktur von **80** verweist in der Differenzelektronendichte auf insgesamt neun Wasserstoffatome, wobei ein Proton am N1'-Stickstoffatom des 5-Amino-1,2,4-Triazol-Rings lokalisiert ist. Die Bindungslängen für N4'-C5' ($1,323 \pm 0,002 \text{ \AA}$) und N2'-C3' ($1,304 \pm 0,002 \text{ \AA}$) sind deutlich kürzer als N1'-C5' ($1,331 \pm 0,003 \text{ \AA}$), so daß vermehrter Doppelbindungcharakter dieser Bindungen in der Struktur von **80** zugeordnet werden kann. Der Bindungswinkel für C3-S-C3' liegt bei $101,8^\circ$.

Tab. 30: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik der Kristallstruktur von 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid (80**).** Die Verbindung wurde aus wäßriger Lösung (pH-Wert 8,5) kristallisiert und unter kryogenen Bedingungen (-140°C) auf einem Vierkreis-Diffraktometer (Mo-K α -Strahlung) mit CCD-Detektor an der Universität Göttingen (AG Sheldrick) vermessen.

	80
Raumgruppe	C2/c
Zellkonstanten	
a (Å)	10,532
b (Å)	10,800
c (Å)	24,963
β (deg)	99,63
Wellenlänge des Primärstrahls (Å)	0,71073
Zahl der gemessenen Röntgenreflexe	2418
Zahl der Röntgenreflexe mit $F_o > 4\sigma(F_o)$	1849
R-Faktor ^b (%)	6,95
Zahl der Wassermoleküle	4
^a 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-yl-sulfanyl)-phthalsäurehydrazid (80)	
^b Für Röntgenreflexe mit $F_o > 4\sigma(F_o)$.	

5.6 Vorschläge für weitere Design-Zyklen

Die Bindungsaffinitäten und Kristallstrukturen von TGT·**79** und TGT·**80** zeigen, daß 1,2,4-Triazole vermutlich keine idealen Bausteine zur Erweiterung der Leitstruktur 4-Aminophthalsäurehydrazid sind. Als mögliche Erklärung können repulsive Wechselwirkungen angeführt werden, die eine ungünstige Ausrichtung der Donor- bzw. Akzeptor-Gruppen des 1,2,4-Triazol-Rings gegenüber Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ zur Folge haben. Die Synthese und experimentelle Charakterisierung eines 6-Ring-Thiolderivats, beispielsweise eines der vorgeschlagenen Thiole (Tab. 25), könnte Aufschlüsse darüber geben, ob planare Ringe prinzipiell ein optimales Wechselwirkungsmuster in der polaren Tasche erlauben. Modellierungen mit dem Programm SYBYL haben ergeben, daß ein tertiäres C-Atom an S3 in **84** günstige geometrische Ausrichtungen potentieller Substituenten zu Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ in dieser Position ermöglichen würde (Abb. 46).

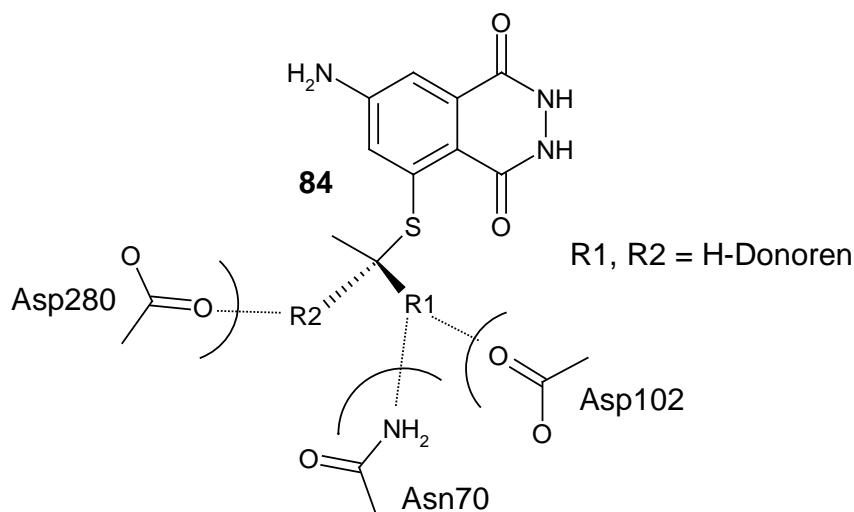


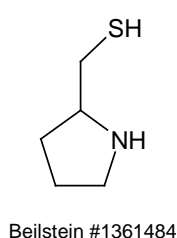
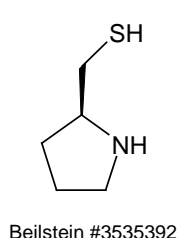
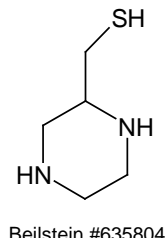
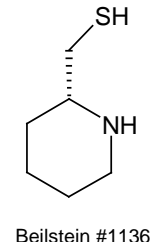
Abb. 46: Mögliche Ausrichtung von H-Donoren in der polaren Tasche zu den Aminosäuren Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰, die über ein sp³-C-Atom zu S3 von **84** verknüpft sind.

Eine solche Anordnung wäre denkbar im Strukturelement S3-CH₂-X, wobei X ein Ringsubstituent ist, oder in S3-CH-XY mit CH-XY als Bestandteil des Rings. Einige Vorschläge für solche Substituenten sollen nachfolgend vorgestellt werden.

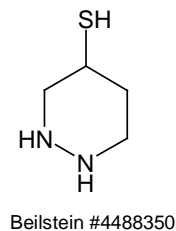
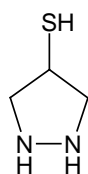
5.6.1 Suche nach Alizyklen mit Thiol-Gruppe

Die Suche nach Thiolen mit den angeführten Struktureigenschaften erfolgte in der Beilstein-Datenbank, wobei ausschließlich gesättigte 5- und 6-Ringe mit mindestens einer Donor- oder Akzeptor-Gruppe berücksichtigt wurden.

Für das Strukturelement S3-CH₂-X wurden einige interessante Vorschläge gefunden, darunter Pyrrolidin-2-methanthiol (**85**) bzw. das Stereoisomer (S)-Pyrrolidin-2-methanthiol (**86**), Piperazin-2-methanthiol (**87**) und eine stereoselektive Synthese für (R)-Piperazin-2-methanthiol (**88**).

**85****86****87****88**

Entsprechende Vorschläge mit direkt am Ring gebundenen Thiol-Gruppen (Strukturelement S3-CH-XY) waren z.B. 4-Pyrazolidinthiol (**89**) und 4-Piperidazinthiol (**90**).

**90**

Alle gefundenen Verbindungen enthielten mindestens eine NH-Gruppe als H-Donor, die unter den Kristallisations- bzw. Enzymassay-Bedingungen bei pH 8,5 vermutlich protoniert vorliegen, da die pK_a-Werte von Pyrrolidinen und Piperidinen etwa im Bereich von 8 - 12 liegen (Perrin, 1965).

5.6.2 Docking und Bewertung der Vorschläge

Wie in Kapitel 5.5.2 beschrieben, wurden 3D-Strukturmodelle der Vorschläge aus Kapitel 5.6.1 mit SYBYL erzeugt. Diese wurden mit FlexX (Kapitel 4.5.2) in die Bindetasche der *Z. mobilis* TGT eingedockt und die Docking-Positionen mit DrugScore (Kapitel 4.6.2) bewertet.

Der (S)-Pyrrolidin-2-methanthiol-Ring (**86**) des in 6-Position substituierten Derivats von **24** wurde von FlexX in der polaren Tasche platziert (Abb. 47). Dabei bildete die Pyrrolin-NH-Gruppe eine H-Brücke zu Asp²⁸⁰ (3,1 Å) und die mit DrugScore (Kapitel 5.5.3) berechnete Bindungskonstante (pK_i calc.) dieser FlexX-Lösung (Rang: # 4) lag bei 6,57.

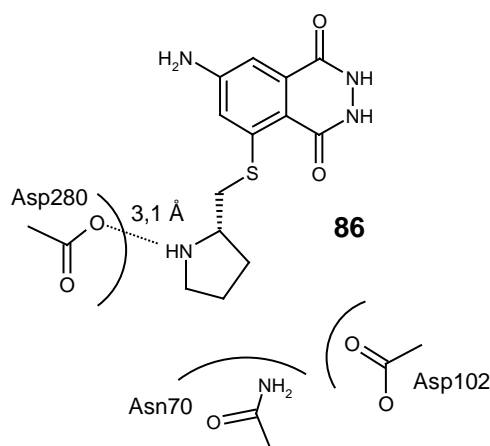


Abb. 47: Docking-Positionen des (S)-Pyrrolidin-2-methanthiol-Derivats (86**) der Leitstruktur **24**.** Die mit FlexX gedockte Lösung zeigte eine H-Brücke zu Asp²⁸⁰ in der polaren Tasche. Die berechnete Bindungskonstante (pK_i calc.) von **86** mit DrugScore lag bei 6,57, für die unsubstituierte Leitstruktur **24** wurde ein experimenteller pK_i -Wert von 5,08 ermittelt (Kapitel 5.5.3).

Für das entsprechende Piperazin-2-methanthiol-Derivat (**87**) der Leitstruktur zeigte die beste FlexX-Lösung (pK_i (calc.) = 6,80; Rang: # 4) H-Brücken zu allen drei Aminosäuren in der polaren Tasche (Abb. 48; Asp¹⁰²: 3,1 Å; Asn⁷⁰: 2,9 Å und Asp²⁸⁰: 3,1 Å). Dagegen waren die beiden Hydrazin-NH-Gruppen des 4-Piperidazinthiol-Rings (**90**) der besten FlexX-Lösung (Rang: # 1) zu Asp²⁸⁰ (2,4 Å bzw. 2,6 Å) orientiert. Die berechnete Bindungskonstante (pK_i calc.) von **90** lag mit 6,50 etwas niedriger als für **87** (Abb. 48). Dies resultiert vielleicht z.T. aus repulsiven Wechselwirkungen zwischen der 5-CH₂-Gruppe von **90** und Asp¹⁰² (3,1 Å).

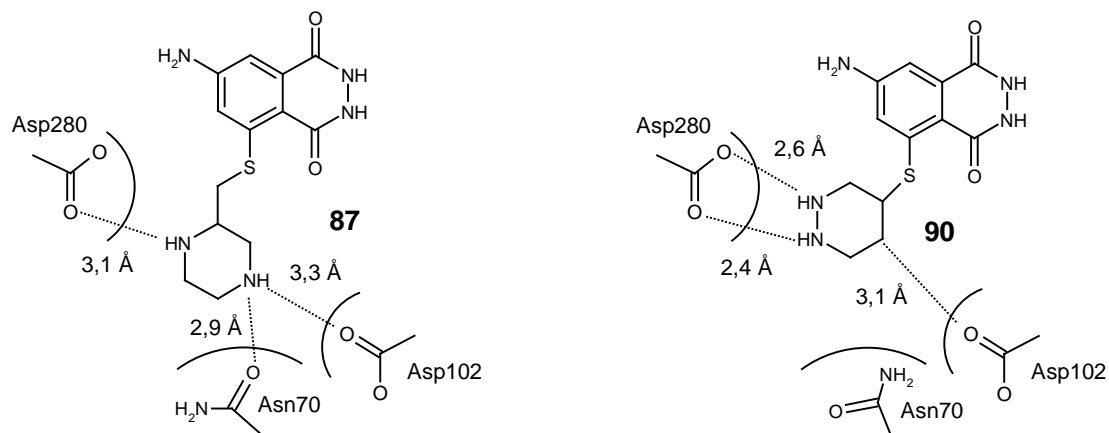


Abb. 48: Docking-Positionen des Piperazin-2-methanthiol- (87) und des 4-Piperidazinthiol-Derivates (90) der Leitstruktur 24. In beiden Fällen zeigten die mit FlexX gedockten Lösungen H-Brücken zu den Aminosäuren Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ in der polaren Tasche. Die mit DrugScore berechnete Bindungskonstante (pK_i calc.) lag bei 6,80 (87) bzw. 6,50 (90), für die unsubstituierte Leitstruktur 24 wurde ein experimenteller pK_i -Wert von 5,08 ermittelt (Kapitel 5.5.3).

6 Diskussion

6.1 Struktur und Biochemie von Mutanten der *Z. mobilis* TGT

6.1.1 S103A-Mutante: Rückschlüsse auf den Enzymmechanismus

Die Ergebnisse der strukturellen und biochemischen Studien mit der Serin-103-Alanin Mutante der *Z. mobilis* TGT (Kapitel 5.1.1) stehen in Einklang mit dem postulierten Enzymmechanismus (Romier et al., 1996c). Danach verläuft der Basenaustausch in zwei konsekutiven S_N2 Reaktionen unter Ausbildung einer kovalenten TGT/tRNA-Zwischenstufe, wobei die β -Konfiguration am C1'-Atom der Ribose erhalten bleibt (Abb. 49).

Der nukleophile Angriff erfolgt durch die Carboxylatgruppe von Asp¹⁰² am C1'-Atom der Ribose von Guanosin-34. Nach Verdrängung des Guanins durch preQ₁ (3) im aktiven Zentrum wird in einer zweiten nukleophilen Substitution das Produkt preQ₁(34)tRNA erhalten. Durch die 66 kDa-Bande im Gelshift-Experiment (Abb. 9, Kapitel 5.1.1.2) wurde gezeigt, daß TGT(S103A) einen kovalenten Komplex mit tRNA^{Tyr} ausbilden kann. In diesem Gelshift-Experiment konnte auch eine Bande bei etwa 97 kDa in der Mischung TGT(S103A)/tRNA gefunden werden (Abb. 9, Kapitel 5.1.1.2). Diese war nicht anwesend in der Mischung TGT(w.t.)/tRNA. In einer früheren Studie mit einer Asp-156-Ala Mutante der *Z. mobilis* TGT konnte ebenfalls eine 97 kDa-Bande gefunden werden (Romier et al., 1996c). Die tRNA^{Tyr} kann unter bestimmten Bedingungen (Salzkonzentration, Temperatur) als Dimer in Lösung vorliegen. Das tRNA^{Tyr}-Dimer bindet als Substrat an die *E. coli* TGT und der entsprechende Komplex kann in einem Gelshift-Experiment als 97 kDa-Bande identifiziert werden (Curnow & Garcia, 1994). Daher könnte die in dieser Arbeit gefundene 97 kDa-Bande einem 1:2-Komplex aus TGT(S103A) und tRNA^{Tyr} entsprechen. Die Gelshift-Studien zeigen damit eindeutig, daß Ser¹⁰³ nicht als Nukleophil am Basenaustausch des Guanin-34 beteiligt ist. Im Enzymassay (Kapitel 5.1.1.2) wurde im Vergleich mit dem TGT-Wildtyp eine dramatische Reduktion der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_m) um drei Größenordnungen von TGT(S103A) gefunden. In Übereinstimmung mit den Eigenschaften von *E. coli* TGT(S90A) (Reuter et al., 1994) führte die Serin-103-Alanin Mutation der *Z. mobilis* TGT jedoch nicht zu einer kompletten Inaktivierung des Enzyms. Die Röntgenstrukturanalyse der *Z. mobilis* TGT(S103A) in Komplex mit preQ₁ zeigte dessen Anwesenheit in der Bindetasche

(Abb. 10, Kapitel 5.1.1.3.). Die Form der positiven $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte deutete auf einen analogen Bindungsmodus des preQ_1 wie in der Wildtyp-TGT (Romier et al., 1996b) hin. Somit wird das Guanosin-34 der tRNA in der preQ_1 -Bindetasche von TGT(S103A) spezifisch gebunden und erklärt die beobachtete Restaktivität des Enzyms. Die $2F_o - F_c$ -Dichte von TGT(S103A)· preQ_1 ist jedoch im Bereich der 2-NH₂-Gruppe von preQ_1 und des Hydroxyphenyl-Restes von Tyr¹⁰⁶ (Abb. 10, Kapitel 5.1.1.3) unterbrochen. Die zerissene Form der Dichte resultiert wahrscheinlich aus einer Unordnung des preQ_1 -Moleküls in der Bindetasche.

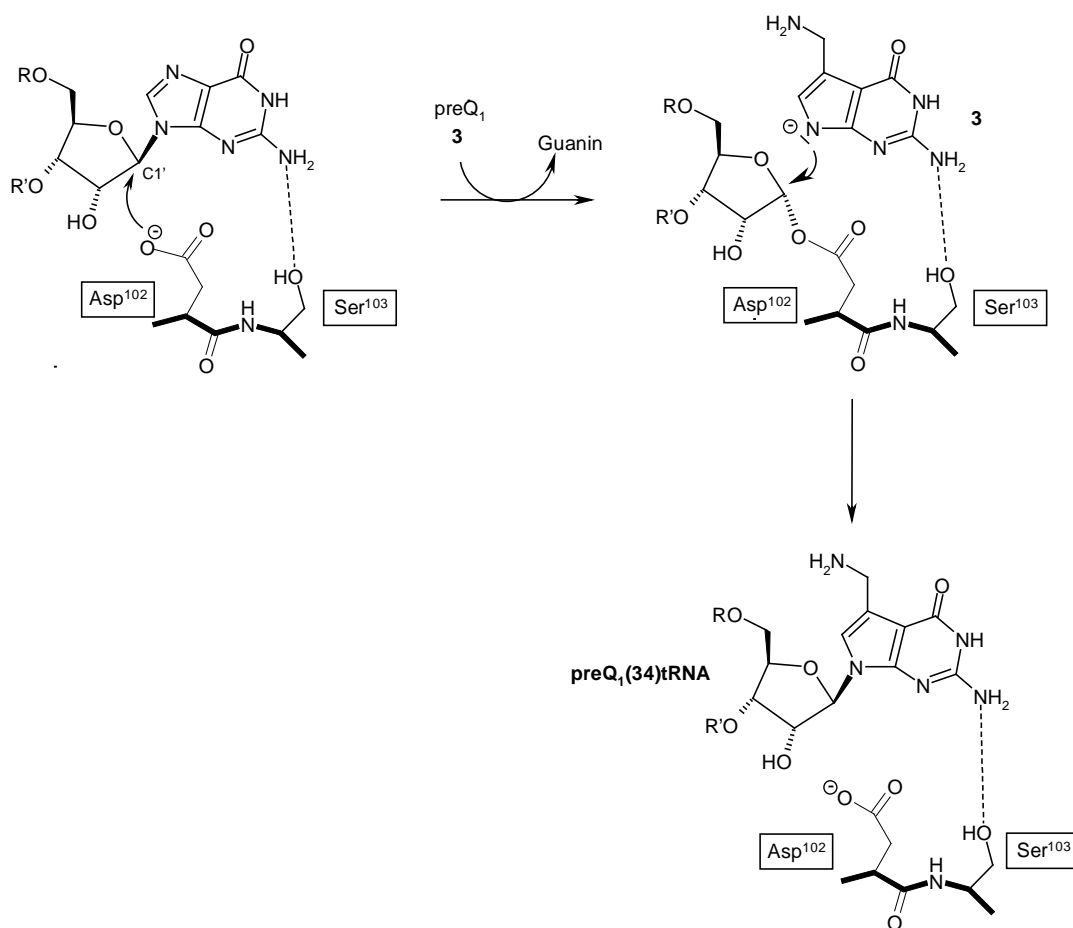


Abb. 49: Postulierter Enzymmechanismus der Basenaustausch-Reaktion mit Asp¹⁰² als Nukleophil im aktiven Zentrum. Der nukleophile Angriff von Asp¹⁰² erfolgt am C1'-Atom der Ribose unter Bildung einer kovalenten TGT/tRNA-Zwischenstufe. Die nachfolgende nukleophile Substitution des deprotonierten preQ_1 (3) resultiert in einer Erhaltung der β -Konfiguration der modifizierten $\text{preQ}_1(34)\text{tRNA}$. Die Aminosäure Ser¹⁰³ im aktiven Zentrum hat eine wichtige Funktion bei der Orientierung des Guanin-Restes der tRNA.

Eine Überlagerung aller Hauptkettenatome („C α -fit“) von TGT·**3** und TGT(S103A)·**3** läßt eine leichte Rotation des preQ₁-Moleküls in Richtung der Amidgruppe von Gly²³⁰ erkennen (Abb. 10, Kapitel 5.1.1.3). In der Wildtyp-Struktur von TGT·**3** konnte eine schwache Wasserstoffbrücken-Bindung (3,5 Å) zwischen der 2-NH₂-Gruppe von preQ₁ und Ser¹⁰³ gefunden werden (Romier et al., 1996b). Diese Wechselwirkung könnte einen wichtigen Beitrag für die Immobilisierung des Guanosin-34 in einer Bindungsposition liefern, die den nukleophilen Angriff von Asp¹⁰² bzw. die Stabilisierung des Übergangszustandes durch Asp¹⁰² ermöglicht (Grädler et al., 1999). Die Entfernung der OH-Gruppe von Ser¹⁰³ und damit die Einführung eines hydrophoben Alanin-Restes in TGT(S103A) resultiert in einer Änderung der lokalen Umgebung von preQ₁. Ein zusätzliches Wassermolekül wird benachbart zu Ala¹⁰³ in der verfeinerten Struktur von TGT(S103A)·**3** gefunden, das eine H-Brücke (2,8 Å) zu der 2-NH₂-Gruppe von preQ₁ bildet. Dieses Wassermolekül ersetzt formal die Serin-OH-Gruppe und übernimmt somit die Funktion von Ser¹⁰³ bei der Ausbildung einer H-Brücke zu der 2-NH₂-Gruppe von **3**. Die über die Temperaturfaktoren angedeutete höhere Flexibilität des preQ₁ in der Kristallstruktur von TGT(S103A)·**3** läßt auf eine weniger restriktive räumliche Fixierung des preQ₁-Moleküls schließen. Das eingelagerte Wassermolekül neben Ala¹⁰³ kann über eine entsprechende H-Brücke wahrscheinlich nur bedingt diese Fixierung erreichen. Somit erfüllt Ser¹⁰³ eine kritische Funktion bei der Immobilisierung und Orientierung des Guanosin-34 in der Basenaustausch-Reaktion.

6.1.2 Y106W-Mutante: Entwicklung eines alternativen Fluoreszenz-Assays?

Die angewendete Mutagenese-Strategie zur Konstruktion von TGT(Y106W) umfaßte insgesamt drei PCR-Reaktionen und einen Klonierungsschritt (Abb. 11, Kapitel 5.1.2.1) und war somit aufwendiger als die in einem PCR-Schritt erhaltene Mutante TGT(S103A) (Kapitel 5.1.1). Allerdings wurden mit dieser Methode im Vergleich zur Ein-Schritt-Methode aus bisher völlig unbekannten Gründen bei Mutagenese-Experimenten wesentlich mehr mutierte Klone erhalten.

Durch Austausch von Tyr¹⁰⁶ gegen einen Tryptophan-Rest wurde die katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) der erzeugten Mutante TGT(Y106W) nur geringfügig (Faktor 15) gegenüber dem Wildtyp der *Z. mobilis* TGT reduziert (Tab. 7, Kapitel 5.1.2.2). Dies war im wesentlichen auf einen sechsfach höheren K_{m} -Wert (2,39 μM) der Mutante verglichen mit dem Wildtyp ($K_{\text{m}} = 0,38 \mu\text{M}$) zurückzuführen. Die $2F_{\text{o}}-F_{\text{c}}$ -Dichte der verfeinerten Struktur von TGT(Y106W) zeigt unterbrochene Bereiche für die Indol-Seitenkette von Trp¹⁰⁶ und deutet

somit eine Flexibilität dieses Restes an (Abb. 12, Kapitel 5.1.2.3). Eine Orientierung von Trp¹⁰⁶ zur Carboxylatgruppe von Asp¹⁵⁶, wie sie in der Wildtyp-TGT für Tyr¹⁰⁶ gefunden (Abb. 4, Kapitel 2.4.2) wird, ist jedoch nicht mit der experimentell gefundenen Differenzelektronendichte vereinbar. Der minimale Abstand zwischen der NH-Gruppe des Indol-Rings und einem Sauerstoffatom von Asp¹⁵⁶ beträgt 3,1 Å nach Einstellen der entsprechenden Torsionswinkel für Trp¹⁰⁶. In der Struktur von TGT(Y106W)-3 ist das Substrat eindeutig in der 2F_o-F_c-Dichte definiert und in einer identischen Position wie in der Struktur der Wildtyp-TGT gebunden (Abb. 13, Kapitel 5.1.2.3). Allerdings konnte auch hier die Ausrichtung der Seitenkette von Trp¹⁰⁶ nicht eindeutig bestimmt werden, da die Konformation des Indol-Restes (wie in der apo-Form) vermutlich nicht durch eine gerichtete Wechselwirkung fixiert ist. Die Flexibilität von Trp¹⁰⁶ erklärt wahrscheinlich den deutlich erhöhten K_m-Wert der Mutanten. Somit ist in Bezug auf die Wildtyp-TGT erst bei einer sechsmal höheren Substratkonzentration das aktive Zentrum der Mutanten zur Hälfte gesättigt (Kapitel 4.1.8.1). Die schlechtere katalytische Effizienz von TGT(Y106W) steht in Einklang mit der Beobachtung, daß alle bekannten TGT-Sequenzen aus Pro- und Eukaryoten sowie Archaeobakterien einen Tyrosin- oder in der Mehrzahl der Fälle einen Phenylalanin-Rest an Position 106 enthalten (Romier et al., 1997).

Die Tyrosin-106-Tryptophan-Variante von *Z. mobilis* TGT wurde in der Absicht konstruiert und biochemisch charakterisiert, eine Voraussetzung für die Etablierung eines alternativen Fluoreszenzassays zu schaffen (Kapitel 5.1.2). Die Affinitätsbestimmung von Liganden könnte dabei durch eine Fluoreszenztitration erfolgen, wobei die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz von TGT(Y106W) gemessen wird. Durch Ligandbindung würde sich die lokale Umgebung des Tryptophan-Restes im aktiven Zentrum ändern und könnte dadurch die Fluoreszenzintensität am Maximum der Emissionswellenlänge („Quenching“) beeinflussen. Ein „Quenching“ der Fluoreszenz kann durch vielfältige Mechanismen ausgelöst werden, u.a. durch Änderung der Polarität in der Mikroumgebung eines Tryptophan-Restes. Dies führt zu einem Energietransfer vom Tryptophan-Rest im angeregten Zustand an die unmittelbare Umgebung, z.B. an einen gebundenen Liganden (Eftink, 1997). Das Emissionsmaximum von Tryptophan-Resten liegt im Bereich zwischen 308 nm (vergraben in unpolarer Umgebung) und 350 nm (Lösungsmittel-exponiert) (Eftink, 1991). Zur Bestimmung der Bindungsaffinität (K_d-Wert) von Liganden wird häufig die Änderung der Fluoreszenzintensität verfolgt (Ward, 1985). Die TGT(Y106W) Mutante enthält insgesamt fünf Tryptophane, so daß die Zuordnung des Beitrags eines bestimmten Trp-Restes an der gesamten Fluoreszenzänderung möglicherweise erschwert ist. Die Sensitivität der verfolgten Bindungsreaktion kann durch

Einsatz eines Liganden mit einer höheren Fluoreszenzintensität erreicht werden, z.B. indem das Substrat mit einer „fluorophoren“ Gruppe markiert wird. Ein prominentes Beispiel für einen solchen Fluoreszenzmarker ist das 5-(Dimethylamino)-naphthalinsulfonylchlorid (Dansylchlorid), das mit primären Aminen verknüpft werden kann und aufgrund seiner intensiven Fluoreszenz in der Aminosäureanalytik verwendet wird (Bhown *et al.*, 1988). In vielen Fällen resultiert bereits die Eigenabsorption der Liganden bei der Anregungswellenlänge (280 nm) in einer Fluoreszenzänderung („inner filter effects“) und muß durch Anwendung von Korrekturfaktoren aus Referenzmessungen berücksichtigt werden (Ward, 1985). Der Vorteil eines solchen Assays wäre die Vermeidung des Gebrauchs von radioaktivem [8-³H]-Guanin und *in vitro*-transkribierter *E. coli* tRNA^{Tyr}. Mit beiden Materialien ist ein immenser zeitlicher und finanzieller Aufwand verbunden.

6.2 Substratspezifität und Eigenschaften der Bindetasche

Die Struktur der *Z. mobilis* TGT in Komplex mit preQ₁ (**3**, Kapitel 2.4.2) war der Ausgangspunkt für das strukturbasierte Wirkstoffdesign in dieser Arbeit. Das Substrat ist in einer amphiphilen Bindetasche interkaliert und über Wasserstoffbrücken zu Asp¹⁵⁶, Gln²⁰³, Gly²³⁰ und Leu²³¹ spezifisch gebunden. Hydrophobe Wechselwirkungen liegen durch π -Stapelung zwischen dem planaren 7-Deazaguanin-Gerüst und dem aromatischen Hydroxyphenyl-Ring von Tyr¹⁰⁶ auf der einen Seite, sowie Met²⁶⁰ auf der gegenüberliegenden Seite vor (Abb. 4, Kapitel 2.4.2). In dieser Arbeit konnten analoge Bindungsmodi von zwei weiteren 7-Deazaguanin-Derivaten, 7-Methyl-preQ₁ (**18**) und preQ₀ (**2**), gefunden werden (Kapitel 5.2). Die 2F_o-F_c-Differenzelektronendichten der verfeinerten Komplexe zeigen in beiden Fällen jedoch unterbrochene Bereiche für die Liganden, was auf eine unvollständige Population der Moleküle in der Bindetasche zurückzuführen sein könnte. Durch Austausch der CH₂-NH₂-Gruppe (H-Donor) von preQ₁ gegen eine Nitrilgruppe (H-Akzeptor) im preQ₀ wird das Bindungsmuster in Bezug auf das gegenüberliegende Leu²³¹ modifiziert. Die lineare Nitrilgruppe von preQ₀ befindet sich in H-Brücken-Distanz (2,9 Å) zum Amid-NH von Gly²³⁰, jedoch liegen auch repulsive Kontakte zur Carbonylgruppe von Leu²³¹ (2,9 Å) vor. Ein zur TGT analoges Bindungsmotiv wird häufig bei GTP-bindenden Proteinen gefunden (Kjeldgaard et al., 1996). In dieser Studie wurden G-Proteine der vier bekannten Subtypen (Ras-ähnliche bzw. heterotrimere G-Proteine, Translationsfaktoren und Tubuline) berücksichtigt. Dabei werden H-Brücken zwischen dem Asp-Rest der Konsensus-Sequenz Asn-Lys-X-Asp und der 2-NH₂- bzw. der 3-NH-Gruppe von Guanin gefunden. Das O4-Atom des Guanins ist über eine H-Brücke zum Amid-NH eines Ala-Restes oder zu einem Ser-Rest eines konservierten Ser-Ala-Leu-Motivs gebunden. Hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen häufig zu der aliphatischen Seitenkette von Lys aus dem Asn-Lys-X-Asp-Motiv auf der einen Seite des Guanin-Gerüsts. Die andere Seite dieses hydrophoben Bereichs der Bindetasche zeigt dagegen eine größere Variabilität und es werden Leu-, Phe-, Thr- und Cys-Reste gefunden.

Ein weiteres Protein mit einer ähnlichen Bindetasche wie die TGT ist die Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP, E.C. 2.4.2.1). Dieses Enzym katalysiert die reversible Phosphorolyse von Ribonukleosiden und 2'-Deoxyribonukleosiden von Guanin, Hypoxanthin und verwandten Nukleosid-Analoga (Parks & Agarwal, 1972). Im aktiven Zentrum der PNP kann bei Substratbindung eine ausgeprägte Konformationsänderung („induced fit“) beobachtet werden. Eine hochaufgelöste Struktur (1,5 Å) der Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) aus

Kälber-Milz in Komplex mit (1S)-1-(9)-Deazahypoxanthin-9-yl)-1,4-dideoxy-1,4-imino-D-ribitol (**90**) wurde beschrieben (PDB-Code: **1B80**). Darin ist der 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-ribitol-Rest wie im TGT-preQ_i-Komplex in einer amphiphilen Tasche interkaliert, die von einem Phe-Rest auf der einen Seite und durch einen Ala- und Val-Rest auf der anderen Seite geformt wird (Abb. 50). Spezifische Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen des Guanins liegen über H-Brücken zu Glu²⁰¹, Lys²⁴⁴ und Asn²⁴³ vor. Diese Abfolge entspricht ebenfalls der Konsensus-Sequenz Asn-Lys-X-Asp des GTP-Bindungsmotivs (s.o.). Die Ribose ist in einer hydrophoben Tasche (Tyr⁸⁸, Phe¹⁵⁹, Phe²⁰⁰ und His²⁵⁷) lokalisiert, die sich oberhalb bzw. unterhalb des 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-ribitol-Restes befindet. Ein Phosphat-Ion wird neben Arg⁸⁴ und Ser³³ gefunden. Dieser hydrophobe Bereich begünstigt den nukleophilen Angriff des Phosphat-Ions auf das C1'-Atom der Ribose und damit die von der PNP katalysierte Phosphorolyse von Nukleosiden.

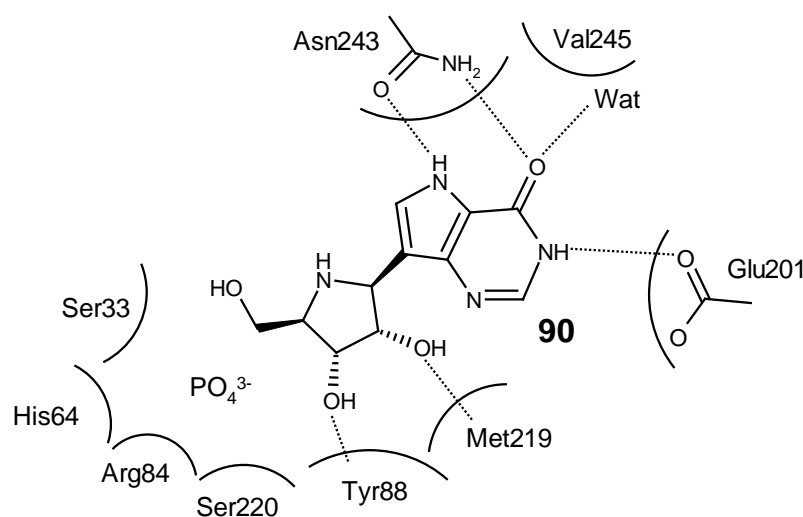


Abb. 50: Bindungstasche der Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) aus Kälber-Milz in Komplex mit (1S)-1-(9)-Deazahypoxanthin-9-yl)-1,4-dideoxy-1,4-imino-D-ribitol (90**).** Der Inhibitor ist in einer hydrophoben Tasche interkaliert und durch H-Brücken zu Glu²⁰¹ und Asn²⁴³ spezifisch gebunden. Der 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-ribitol-Rest bindet in einer hydrophoben Tasche, die von Tyr⁸⁸, Phe¹⁵⁹, Phe²⁰⁰ und His²⁵⁷ (die letzten 3 Reste befinden sich oberhalb bzw. unterhalb des 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-ribitol-Restes) geformt wird. Das nukleophile Phosphat-Ion wird neben Arg⁸⁴ und Ser³³ gefunden.

Für die PNP sind eine Reihe von Studien veröffentlicht worden, in denen ein strukturbasierter Designzyklus durchgeführt wurde, der zu einigen hochaffinen Inhibitoren führte (Babu *et al.*, 1997).

6.3 *De novo*-Design mit LUDI

Ziel des ersten Design-Zyklus (Kapitel 5.3) war die Suche nach neuen Leitstrukturen, die analog zu preQ₁ (**3**) spezifisch in der Bindetasche der *Z. mobilis* TGT binden könnten. Die Kristallstruktur von TGT·**3** (Kapitel 2.4.2) erlaubt dabei wichtige Aufschlüsse über die Anordnung der Aminosäuren, die an der Bindung des Substrates beteiligt sind. Ein Vergleich der apo-TGT mit TGT·**3** und weiteren Komplexen (Kapitel 6.2) zeigt, daß die Bindetasche der TGT relativ rigide ist. Die Positionen der Aminosäuren in der Region der preQ₁-Tasche sind in den bisher diskutierten Kristallstrukturen (TGT·**2**, TGT·**3** und TGT·**18**) im Vergleich zur apo-TGT identisch. Lediglich die Seitenkette von Tyr¹⁰⁶ vollzieht eine konformative Änderung bei Ligandbindung. Die wohldefinierte preQ₁-Bindetasche liefert daher die Basis zur Ableitung eines Pharmakophor-Modells, das für ein strukturbasiertes Inhibitor-Design genutzt werden kann.

In dieser Arbeit wurde das Computer-Programm (Kapitel 4.5.1) LUDI zum *de novo*-Design von Inhibitoren verwendet, da mit dieser Methode sowohl die Generierung eines pharmakophorähnlichen Modells (Wechselwirkungszentren) als auch eine schnelle Datenbanksuche möglich ist. Die strukturelle Information der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren wird dabei zur Ableitung von Wechselwirkungszentren (H-Donoren bzw. -Akzeptoren und lipophile Zentren) genutzt, die einem Pharmakophor-Modell entsprechen. Der Algorithmus von LUDI erfordert die Definition eines Zentrums sowie eines Radius in der Bindetasche, innerhalb dessen die Wechselwirkungszentren („LUDI-sites“) generiert werden sollen. In der ersten Datenbanksuche wurden H-Donoren gegenüber von Asp¹⁵⁶, Asp¹⁰² sowie Leu²³¹ und H-Akzeptoren in Nachbarschaft zu Gly²³⁰, Gln²⁰³ und Ser¹⁰³ generiert (Abb. 18, Kapitel 5.3.1). Die lipophilen „LUDI-sites“ befanden sich zwischen Tyr¹⁰⁶ bzw. Met²⁶⁰ und damit im hydrophoben Bereich der preQ₁-Tasche, der in TGT·**3** mit dem 7-Deazaguanin-Gerüst besetzt ist. Diese Auswahl der Wechselwirkungszentren erwies sich als geeignet, um mit LUDI eine Platzierung von Guanin und preQ₁-Derivaten aus einer Test-Datenbank zu erreichen, die dem experimentellen Bindungsmodus entspricht (Kapitel 5.3.1). Weitere Probeläufe ermöglichten die Optimierung von LUDI-spezifischen Parametern (Tab. 11, Kapitel 5.3.1) für die anschließende Suche im *Available Chemical Directory* (ACD). Die ACD ist eine Datenbank mit über 180.000 Verbindungen (Stand: Juli 1998), die kommerziell erhältlich sind oder deren Synthese in der Literatur bekannt ist. Eine Datenbanksuche in der ACD als erster Schritt beim *de novo*-Design von Inhibitoren bietet somit den Vorteil, daß Vorschläge potentiell bindender Liganden experimentell zugänglich sind.

Die Suche in der ACD erbrachte 162 Vorschläge mit einem LUDI-Score über 280, wobei die zehn Hits mit den höchsten Scoringwerten (560 - 451) kommerziell erhältlich sind (Tab. 12, Kapitel 4.5.1). Zur Beurteilung der Scoringwerte wurde eine LUDI-Suche mit gleichen Eingabe-Parametern in der Test-Datenbank (s.o.) durchgeführt. Für das 7-Methyl-preQ₁ in der kristallographischen Bindungsposition (Abb. 17, Kapitel 5.3.1) berechnete LUDI einen Scoringwert von 700. Der experimentelle K_i-Wert dieser Verbindung liegt bei 0,5 µM (*E. coli* TGT) bzw. 5,1 µM (*Z. mobilis* TGT, Kapitel 5.3.2.2). Die von LUDI berechneten Scoringwerte der zehn besten Hits deuteten somit auf Bindungsaffinitäten im mikromolaren Bereich hin.

Unter den zehn ersten Vorschlägen befanden sich, abgesehen von 3-Iminoisoindolinon (**26**), ausschließlich aromatische Verbindungen mit einem Phenyl- oder Naphthyl-Grundgerüst. Die Verbindungen enthielten mindestens eine H-Donor- und eine H-Akzeptor-Gruppe. In einer genauen Analyse wurden die Plazierungen der vorgeschlagenen Hits in der Bindetasche visuell beurteilt. Das aromatische Ringsystem der beiden Verbindungen mit den höchsten Scoringwerten, 6-Methoxytryptamin (**23**, LUDI-Score = 560) und 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**, LUDI-Score = 542), wurde von LUDI in der gleichen Ebene wie das 7-Deazaguanin-Gerüst von preQ₁ platziert. Die Aminogruppen der beiden Vorschläge aus LUDI befinden sich in optimalen Positionen zu den generierten H-Donor-Wechselwirkungszentren gegenüber von Leu²³¹. Eine solche Anordnung wird auch für die exozyklischen NH₂-Gruppe von preQ₁ gefunden. Die Indol-NH-Gruppe von **23** korrespondiert zu der Position der N3H-Gruppe des preQ₁ gegenüber von Asp¹⁵⁶, während die Hydrazin-Gruppe von **24** über zwei H-Brücken mit dieser Aminosäure wechselwirkt. Eine repulsive Wechselwirkung liegt zwischen der C7H-Gruppe von **23** und einem Carboxylatsauerstoff von Asp¹⁵⁶ vor. Zusätzliche Beiträge zum Scoringwert resultieren in diesem Fall vermutlich aus der Platzierung der Methoxygruppe im Bereich von Ser¹⁰³. Dabei liegt eine H-Brücke zwischen dem Amid-NH von Ser¹⁰³ und dem Sauerstoffatom der OCH₃-Gruppe von **23** vor. Im Gegensatz zum 6-Methoxytryptamin verfügt **24** mit der 2-Carbonylgruppe über einen H-Akzeptor gegenüber der Amid-NH-Gruppe von Gly²³⁰ bzw. der NH₂-Gruppe von Gln²⁰³. Somit wechselwirkt **23** über drei H-Brücken mit dem Protein, dagegen sind in der von LUDI vorgeschlagenen Position von **24** insgesamt fünf solcher Kontakte möglich.

Von den zehn vorgeschlagenen Verbindungen mit den höchsten LUDI-Scores wurden zunächst acht im Enzymassay auf eine Affinität gegenüber der *Z. mobilis* TGT getestet (Kapitel 5.3.2). Dabei konnten für 2,3-Dihydroxybenzoesäure (**28**) und 1,8-Naphthalinsultam (**29**) schwache Affinitäten (K_i = 3000 µM bzw. K_i = 1000 µM) beobachtet werden, während

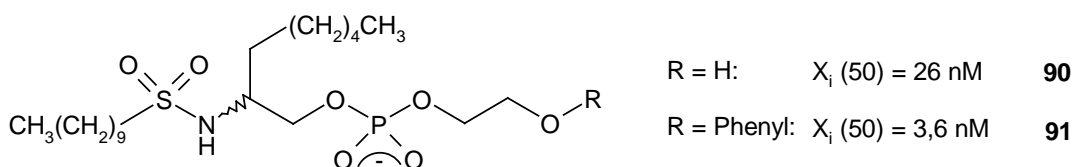
4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) eine deutliche Inhibition ($K_i = 8,3 \mu\text{M}$) zeigte (Tab. 13, Kapitel 5.3.2.1). Für die übrigen fünf getesteten Verbindungen aus der ersten LUDI-Suche konnte keine signifikante Inhibition gefunden werden. Die kristallographische Charakterisierung des Bindungsmodus durch „Soaking“ der Verbindungen in Kristalle der *Z. mobilis* TGT war nur bei **24** erfolgreich (Tab. 16, Kapitel 5.3.3). Die Bindungsposition von 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) ist eindeutig in der $2F_o - F_c$ -Differenzelektronendichte definiert und stimmt sehr gut mit dem Docking-Ergebnis von LUDI überein (Abb. 21 und 22, Kapitel 5.3.4). Das 4-Aminophthalsäurehydrazid wechselwirkt über H-Donoren (die NH-NH- bzw. NH_2 -Gruppe) mit beiden Carboxylatsauerstoffen von Asp¹⁵⁶ und zu Leu²³¹. Die 2-Carbonylgruppe (H-Akzeptor) von **24** bildet H-Brücken zu Gln²⁰³ und Gly²³⁰ und hydrophobe Kontakte liegen zu Tyr¹⁰⁶ und Met²⁶⁰ vor. Dieses Wechselwirkungsmuster gleicht dem von preQ₁ und erklärt sowohl die hohe Affinität von **24** als auch die wohldefinierte Kristallstruktur aufgrund einer spezifischen Bindung. Mit keinem der übrigen neun LUDI-Vorschläge (Tab. 12, Kapitel 4.5.1) ist ein solches Bindungsmuster in der preQ₁-Tasche der *Z. mobilis* TGT möglich. Auch im Fall der preQ₁-Analoge resultiert der Verlust einer der genannten H-Brücken (derjenigen zu Leu²³¹) in einer Reduktion der Bindungsaffinität. Das Auftreten von repulsiven Interaktionen, wie z.B. zwischen der C7H von 6-Methoxytryptamin (**23**) und Asp¹⁵⁶, sollte sich ebenfalls ungünstig auf die Affinität auswirken.

Die Benzoessäure-Derivate **28** und **30** wurden jeweils in ihrer neutralen Form von LUDI in der Bindetasche positioniert. In beiden Fällen wird eine Platzierung der protonierten Carboxylatgruppe gegenüber von Asp¹⁵⁶ vorgeschlagen und ein guter Scoringwerte von LUDI (**28**: 471; **30**: 463) berechnet. Aufgrund der sauren Eigenschaften von Benzoessäuren kann jedoch angenommen werden, daß **28** (pK_a -Wert 2,83) und **30** (pK_a -Wert 4,06) bei den „Soaking“-Bedingungen (pH-Wert 8,5) deprotoniert vorliegen. Dies sollte auch auf 1,8-Naphthalinsultam (**29**) zutreffen (pK_a -Wert 5,9), das schwache Inhibition im millimolaren Bereich ($K_i = 1000 \mu\text{M}$) zeigte. In der anionischen Form würden repulsive Kontakte zwischen **28**, **29** bzw. **30** und der Carboxylatgruppe von Asp¹⁵⁶ vorliegen. Dies würde die geringen Bindungsaffinitäten sowie die Mißerfolge beim „Soaking“ dieser Verbindungen erklären.

Im ersten Design-Zyklus mit LUDI konnte mit 4-Aminophthalsäurehydrazid eine Verbindung gefunden werden, die einige wichtige Charakteristika einer Leitstruktur für das struktur-basierte Wirkstoffdesign erfüllt: die Bindungskonstante liegt unter $10 \mu\text{M}$ (Verlinde & Hol, 1994), der experimentelle Bindungsmodus ist bekannt, die Struktur der Verbindung ist relativ

einfach aufgebaut (u.a. keine Stereozentren) und sie kann zur Verbesserung ihrer Eigenschaften (Affinität, Bioverfügbarkeit, Toxizität,...) leicht chemisch modifiziert werden. Erfolgreiche Anwendungen von LUDI zur Leitstruktursuche sind in der Literatur nur vereinzelt zu finden. In einer ersten Studie (Böhm, 1994b) wurde eine LUDI-Suche mit vier ausgewählten Protein-Targets (Trypsin, Streptavidin, Purin-Nukleosid-Phosphorylase und HIV-Protease) durchgeführt. Für alle vier Proteine konnten neue Vorschläge aus einer Datenbank von etwa 30.000 Verbindungen erhalten werden, in zwei Fällen (Trypsin und Streptavidin) waren darunter bekannte Inhibitoren. Interessanterweise wurde für die Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) das 3-Iminoisindolinon (**25**) als Ligand mit dem höchsten Scoringwert gefunden. Diese Verbindung wurde auch bei der LUDI-Suche mit der TGT vorgeschlagen, was vermutlich auf die Ähnlichkeit der aktiven Zentren beider Proteine zurückzuführen ist (Kapitel 6.3).

In einem anderen Beispiel wurde LUDI zur Modifikation eines Inhibitors der sekretorischen Phospholipase (PLA₂), einem 1-Octylphosphoglykol-Derivat (**90**), verwendet (Pisabarro *et al.*, 1994). Ausgangspunkt war die Kristallstruktur der PLA₂ in Komplex mit einem Inhibitor, der in einer Modellierungsstudie durch die Struktur von **90** (R = H) ersetzt wurde. Dieses Modell wurde zur Suche nach Substituenten (R) an der terminalen OH-Gruppe verwendet, die eine hydrophobe Tasche in diesem Bereich der Bindetasche füllen sollten. Unter zahlreichen Vorschlägen war auch ein Phenyl-Rest, wobei das entsprechende Phenyl-Derivat **91** einen fast zehnfach höheren Inhibitionseffekt (X_i 50 = 3,6 nM) verglichen mit der unsubstituierten Verbindung (X_i 50 = 26 nM) aufwies.



Ein weiteres Beispiel beschreibt die Anwendung von LUDI bei der Generierung neuer Ideen für das *de novo*-Design von FKBP-12-Liganden (Babine *et al.*, 1995). Das FKBP-12-Protein wurde aufgrund seiner Affinität zum Immunsuppressivum FK506 entdeckt und ist in einer noch nicht ganz geklärten Weise an der Proteinfaltung und der Signaltransduktion beteiligt. Die Kristallstruktur von FKBP-12 in Komplex mit FK506 wurde zur Datenbanksuche mit LUDI verwendet, wobei eine Vielzahl kleiner organischer Moleküle vorgeschlagen wurde (Abb. 51). Darunter konnte Adamantan (**92**) als Strukturfragment ausgewählt werden und in

einer weiteren LUDI-Suche (im „Link Modus“) Vorschläge für Substituenten des Adamantyl-Restes erhalten werden. Der „Link Modus“ von LUDI ermöglicht die Derivatisierung einer Leitstruktur durch Anfügen kleinerer Fragmente aus einer Datenbank in einer benutzerdefinierten Position. Das 3-Hydroxyphenyl-Derivat (**93**) erwies sich als ein geeigneter Vorschlag und wurde durch weitere Modellierung in die [3.3.1]-bicyklische Carbonylverbindung (**94**) abgewandelt. Ausgehend von dieser Leitstruktur wurden einige Verbindungen getestet, wobei das m-Cresol-Derivat (**95**) bereits eine gute Bindungsaffinität ($K_i = 16,7 \mu\text{M}$) hatte. Ein Thiol-4-pyridino-Derivat zeigte eine verbesserte Affinität ($K_i = 7,9 \mu\text{M}$) und bindet in Form des (S)-Enantiomers (**96**).

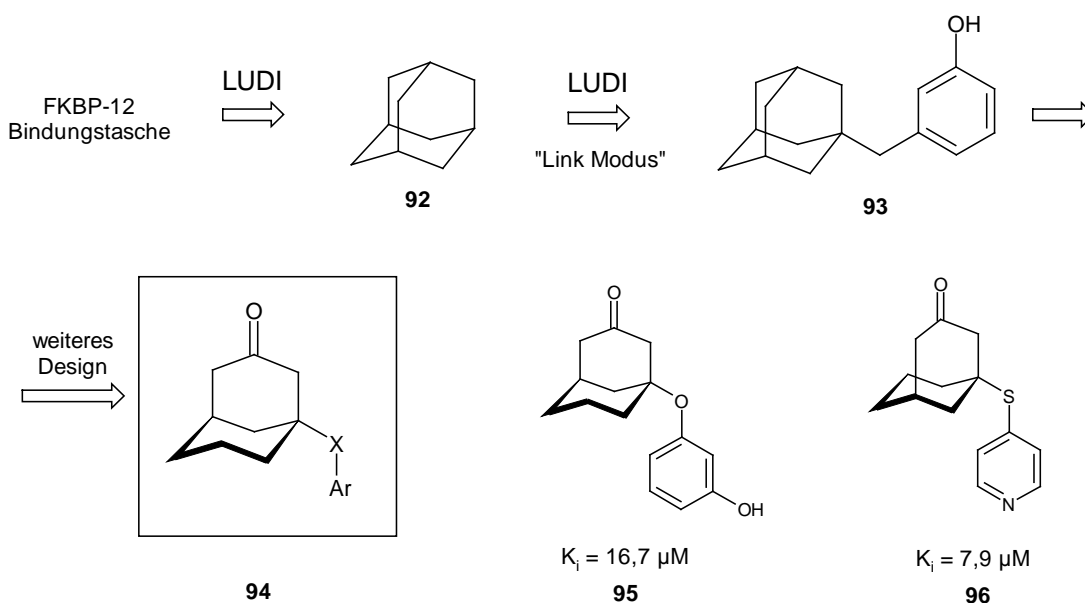


Abb. 51: De novo-Design von FKBP-12-Inhibitoren. In einer ersten LUDI-Suche wurde das Adamantan (**92**) als Strukturelement in der FK506-Tasche gefunden, das in einer weiteren Suche im „Link-Modus“ von LUDI zu einem 3-Hydroxyphenyl-Derivat erweitert (**93**) wurde. In weiteren Modellierungsschritten wurde die Leitstruktur (**94**) konstruiert und einige Derivate experimentell getestet. Das m-Cresol-Derivat (**95**) zeigte mikromolare Affinität ($K_i = 16,7 \mu\text{M}$), das Thiol-4-pyridino-Derivat wurde in Form des (S)-Enantiomers (**96**) gebunden ($K_i = 7,9 \mu\text{M}$).

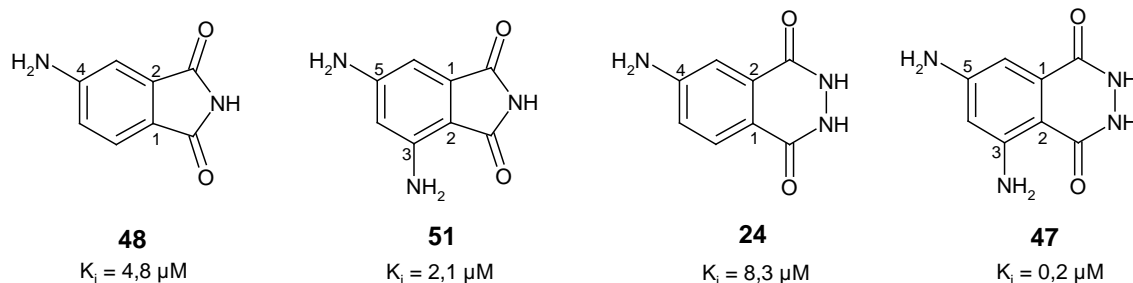
6.4 Bindungsmodus und Aktivität von Leitstruktur-Derivaten

6.4.1 Zweiter Design-Zyklus

Die LUDI-Suche im ersten Design-Zyklus erbrachte mit 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) eine Verbindung, die als Leitstruktur optimale Voraussetzungen für das weitere *de novo*-Design bietet. Ausgehend von der wohldefinierten Kristallstruktur (1,95 Å Auflösung) in Komplex mit der *Z. mobilis* TGT wurde zunächst die Bindetasche analysiert, um Ideen für strukturell erweiterte Derivate von **24** zu generieren (Abb. 23, Kapitel 5.4.1). Die Region der Bindetasche benachbart zu dem Molekülgerüst von **24** enthält mit Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ drei polare Aminosäuren. Zur optimalen Ausfüllung dieser polaren Tasche bieten sich z.B. 5- oder 6-Ringe, in Analogie zu dem Riboserest von Guanosin-34 an, der in diesem Bereich wahrscheinlich wechselwirkt (Kapitel 6.2). Die Bindung von starren Ringstrukturen ist in der Regel mit einem kleineren Verlust an inneren Freiheitsgraden verbunden als die von flexiblen, kettenförmigen Liganden. Aus entropischen Gründen sollte dies zu einer Verbesserung der Affinität führen. Daher wurden ausschließlich Ring-Substituenten als Erweiterung von **24** berücksichtigt. Die polare Tasche ist mit mehreren Wassermolekülen gefüllt, deren Verdrängung durch einen vergrößerten Liganden ebenfalls einen Entropiegewinn und damit eine verbesserte Bindungsaffinität hervorrufen sollte (Böhm & Klebe, 1996). Weiterhin wurden Ring-Substituenten mit H-Donor-Gruppen (z.B. NH₂-Gruppen) gesucht, die H-Brücken zu Asp¹⁰² und Asp²⁸⁰ ausbilden können. Diese Wechselwirkungen müssen die zur Ligandbindung erforderliche Desolvatation der Aminosäuren kompensieren. Aufgrund der Kristallstruktur von TGT-**24** bot sich eine Derivatisierung des Liganden in 5- oder 6-Position (Abb. 24, Kapitel 5.4.1) mit 5- oder 6-Ring-Substituenten an.

Die Suche nach einfach zugänglichen Bausteinen im *Available Chemical Directory* und in der Beilstein-Datenbank (Kapitel 5.4.2) erbrachte eine Synthesevorschrift (Fischer & Kvita, 1985) zur regioselektiven Einführung von Thiolen in die 3-Position von 3,5-Dinitrophthalsäureimid (**45**, Abb. 28, Kapitel 5.4.2). Die Ausgangsverbindung **45** konnte durch Oxidation der kommerziell erhältlichen Verbindung 3,5-Dinitro-2-methylbenzoesäure (**49**, Abb. 29, Kapitel 5.4.3.1) dargestellt werden. Eine anschließende Reduktion der Nitrogruppen mit Zinn(II)chlorid erbrachte das 3,5-Diaminophthalsäureimid (**51**) und daraus durch weitere Umsetzung mit Hydrazin das 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**47**). Zusammen

mit dem kommerziell erhältlichen 4-Aminophthalsäureimid konnten somit die Bindungseigenschaften der Phthalsäureimide mit den entsprechenden Hydraziden verglichen werden (Tab. 19, Kapitel 5.4.3).

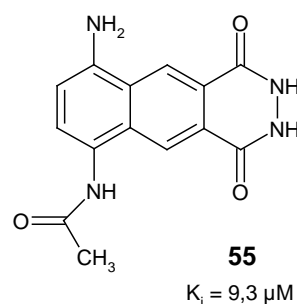
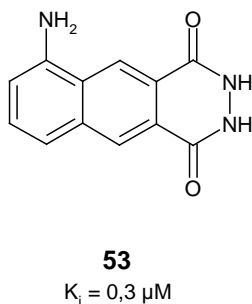
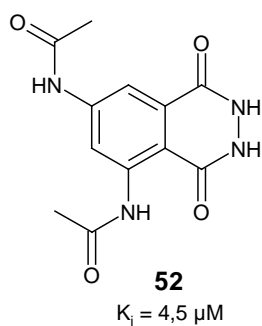


In dieser Reihe zeigte das 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**47**) mit $0,2 \mu\text{M}$ die höchste Bindungsaffinität zu der *Z. mobilis* TGT, also eine Verbesserung um den Faktor 40 gegenüber der Leitstruktur 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**, $K_i = 8,3 \mu\text{M}$). In der Kristallstruktur von TGT-**47** findet man einen zu **24** analogen Bindungsmodus des Inhibitors (Abb. 30, Kapitel 5.4.3.1). In der Umgebung der zusätzlichen 3-NH₂-Gruppe von **47** befinden sich zwei Wassermoleküle in H-Brückenabstand sowohl zu der Aminogruppe ($3,3 \text{ \AA}$ und $3,2 \text{ \AA}$) als auch zu Asp¹⁰² ($2,9 \text{ \AA}$ und $3,3 \text{ \AA}$). Dieser verbrückende Kontakt liefert vermutlich einen wichtigen Beitrag zu der beobachteten Affinitätssteigerung. Eine Strukturbestimmung der Protein-Inhibitor-Komplexe wurde auch mit den Phthalsäureimiden **48** und **51** versucht, wobei eine bedingte Interpretation der experimentellen Elektronendichte nur im Fall von **51** möglich war (Abb. 31, Kapitel 5.4.3.1). Die positive $|F_o - F_c|$ -Dichte von TGT-**51** zeigte nach dem ersten Verfeinerungszyklus eine zerissene Form, was auf eine erhöhte Unordnung der Struktur im Bereich der potentiellen Bindungsstelle deutete. Diese ist möglicherweise auf das Vorliegen alternativer Bindungsmodi des Inhibitors zurückzuführen, die ggf. auch mit einer niedrigeren Population in der Bindetasche verbunden ist. In einem plausiblen Bindungsmodus ist die 3-Aminogruppe von **51** zu Leu²³¹ ($2,8 \text{ \AA}$) orientiert, während die 5-NH₂-Gruppe Kontakt zu zwei Wassermolekülen hat ($3,3 \text{ \AA}$ bzw. $3,4 \text{ \AA}$). Die 2-Carbonyl-gruppe befindet sich in einem günstigen H-Brückenabstand zu Gly²³⁰ ($2,7 \text{ \AA}$) bzw. Gln²⁰³ ($3,2 \text{ \AA}$). Das Imid-NH ist jedoch in diesem Modell nur über eine schwache H-Brücke zu Asp¹⁵⁶ ($3,6 \text{ \AA}$) gebunden. Aufgrund der schlecht definierten $2F_o - F_c$ -Dichte ist das verfeinerte Strukturmodell aber nur begrenzt aussagefähig im Hinblick auf den bevorzugten Bindungsmodus von 3,5-Diaminophthalsäureimid (**51**). Daher kann über die leicht erhöhte Bindungsaffinität der

Phthalsäureimide (**48**: $K_i = 4,8 \mu\text{M}$; **51**: $K_i = 2,1 \mu\text{M}$) im Vergleich zu 4-Aminophthalsäurehydrazid ($K_i = 8,3 \mu\text{M}$) nur spekuliert werden.

Die besprochenen Phthalsäureimide und -hydrazide sind in dem wäßrigen Puffer, der zur Kristallisation und für den Enzymassay verwendet wurde, relativ schlecht löslich (Kapitel 5.4.3.1). Daher wurde versucht, durch Acetylierung der beiden NH_2 -Gruppen die Löslichkeit von **47** zu beeinflussen. Das entsprechende 3,5-Di-(N-acetylamino)-phthalsäurehydrazid (**52**) zeigte eine verbesserte Löslichkeit in DMSO und im Kristallisationspuffer (Kapitel 5.4.3.1). Die Bindungsaffinität von **52** ($K_i = 4,5 \mu\text{M}$) war jedoch im Vergleich zu **47** ($K_i = 0,2 \mu\text{M}$) um den Faktor 20 reduziert. Auch die Kristallstruktur von **52** in Komplex mit der TGT konnte nicht bestimmt werden, so daß nicht beurteilt werden kann, ob ein analoger Bindungsmodus wie in TGT·**47** vorliegt.

Als weitere Derivate der Leitstruktur wurden 5-Aminophthalsäurehydrazid (**53**) und 8-(N-Acetylamino)-5-aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid (**55**) kristallographisch und kinetisch untersucht (Kapitel 5.4.3.2). Dabei wurde die Fragestellung verfolgt, ob die Erweiterung des aromatischen Ringsystems (Benzol- zu Naphthalingerüst) einen Einfluß auf die Bindungseigenschaften haben würde. In der Kristallstruktur von TGT·**53** findet man eine zu TGT·**24** analoge Orientierung der Hydrazid-NH-NH-Gruppe (Abb. 33, Kapitel 5.4.3.2). Die Position der 5- NH_2 -Gruppe ließ sich in der positiven $|F_o - F_c|$ -Dichte nicht exakt identifizieren, jedoch scheint eine H-Brücke zu Leu²³¹ vorzuliegen ($2,5 \text{ \AA}$).



Die Orientierung der 5- NH_2 -Gruppe sollte durch experimentelle Charakterisierung eines Derivats von **53**, dem 8-(N-Acetylamino)-5-aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid (**55**), aufgeklärt werden. Leider konnte keine interpretierbare $|F_o - F_c|$ -Dichte nach der Verfeinerung von TGT·**55** erhalten werden. Interessanterweise unterschieden sich auch hier die Bindungsaffinitäten von **53** ($K_i = 0,3 \mu\text{M}$) und **55** ($K_i = 9,3 \mu\text{M}$) um den Faktor 30 voneinander (Tab. 21, Kapitel 5.4.3.2).

6.4.2 Dritter Design-Zyklus

Die Ergebnisse des zweiten Design-Zyklus (Kapitel 5.4) haben gezeigt, daß eine weitere Derivatisierung der Leitstruktur 4-Aminophthalsäurehydrazid in 6-Position vielversprechend ist. Im Vergleich zu den entsprechenden Phthalsäureimiden sind die Bindungsmodi der Phthalsäurehydrazide **24** und **47** anhand ihrer Kristallstrukturen wohldefiniert. Eine reproduzierbare Bindungsposition des 4-Aminophthalsäurehydrazid-Gerüsts ist eine wichtige Voraussetzung für das weitere strukturbasierte Design von Derivaten der Leitstruktur. Im dritten Design-Zyklus sollte daher eine Derivatisierung mit Thiolen mit passenden Bindungseigenschaften in der zu **24** benachbarten polaren Tasche verfolgt werden. Aufgrund der bereits angeführten Überlegungen (Kapitel 6.4.1) waren zyklische Verbindungen (5- oder 6-Ringe) gesucht, die neben der Thiol-Gruppe noch über mindestens einen weiteren H-Donor verfügen. Zunächst wurde eine Datenbanksuche im *Available Chemical Directory* (Kapitel 5.5.1) durchgeführt, um synthetisch leicht zugängliche Vorschläge zu erhalten. Zur Einschränkung der Rechenzeit wurde eine schrittweise Filterprozedur mit dem Programm UNITY (Kapitel 4.7) gewählt. Im ersten Schritt konnten aus insgesamt 183.564 Verbindungen 1651 Thiole durch Anwendung eines 2D-Suchkriteriums (Anwesenheit einer SH-Gruppe, Tab. 25, Kapitel 5.5.1) selektiert werden. Darunter befanden sich einige Oligopeptide und weitere höhermolekulare Verbindungen mit einer SH-Gruppe (insgesamt 649), die mit dem Programm SELECTOR aussortiert wurden (Tab. 25, Kapitel 5.5.1). Zur weiteren Selektion auf die Anwesenheit mindestens einer H-Donor-Gruppe wurde mit den verbliebenen 1002 Thiolen eine Pharmakophor-Suche betrieben. Idealerweise sollten dabei auch geometrische Kriterien, also die relative Anordnung des H-Donors in Bezug auf die SH-Gruppe berücksichtigt werden. Als Strukturmodell wurde das aktive Zentrum von TGT-**24** gewählt, um Pseudoatome für die Konstruktion des atombasierten Pharmakophors zu platzieren (Abb. 35, Kapitel 5.5.1). Ein H-Brücken-Donor (*Donor_Atom1*) wurde im Bereich der 6-Position von **24** gewählt, da sich in dieser Position die SH-Gruppe befinden sollte, die formal das Kriterium eines H-Donors erfüllt. In Frage kommende Fragmente mußten darüber hinaus noch mindestens einen weiteren H-Donor (*Donor_Atom2* oder *Donor_Atom3*) in Nachbarschaft zu Asp²⁸⁰ bzw. Asp¹⁰² enthalten. Die Treffer sollten außerdem wenigstens ein hydrophobes Zentrum (*Hydrophobic1* oder *Hydrophobic2*) zwischen den drei Donoren enthalten. Dieses Kriterium sollte die Position des Ringfragmentes festlegen, mit dem die H-Donoren verknüpft sind. Mit dem aufgeführten 3D-Kriterium konnte eine weitere Selektion von 312 Thiolen aus 1002 Kandidaten erreicht

werden. Darunter befanden sich jedoch einige Verbindungen, die aufgrund ihrer Größe nicht in die polare Tasche neben **24** passten. Der Raumanpruch des Proteins wurde daher in Form von „excluded volumes“ in einer erweiterten 3D-Suche berücksichtigt. Als Bereiche, in denen sterische Überlappungen mit einem potentiellen Thiol-Fragment vermieden werden sollten, wurden die Aminosäuren des aktiven Zentrums und die Atome von **24** gewählt (Abb. 35, Kapitel 5.5.1). Dieses abschließende Kriterium reduzierte die Zahl von 312 Kandidaten auf 20 Thiole, von denen 14 kommerziell erhältlich sind (Tab. 26, Kapitel 5.5.1). Unter den 20 Verbindungen sind 14 6-Ring-Thiole enthalten, die in Bezug auf die H-Donor-Gruppen ein analoges Substitutionsmuster am Ring zeigen (Tab. 26, Kapitel 5.5.1). Die SH-Gruppe befindet sich in wenigstens einer der aufgeführten tautomeren Formen in meta-Position zu einem H-Donor (NH₂-, OH- oder NH-Gruppe).

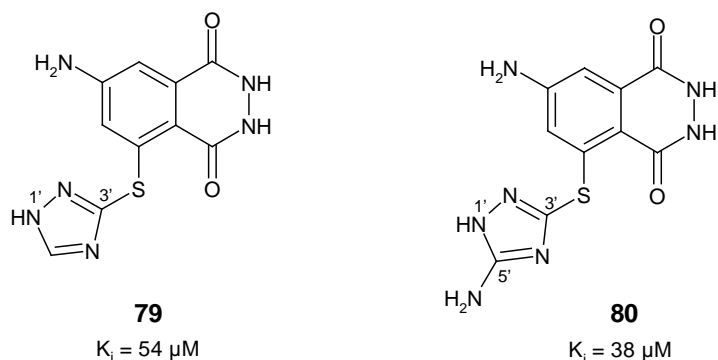
Zur Beurteilung der möglichen Bindungseigenschaften wurden die 20 Thiole in 6-Position mit der Leitstruktur **24** verknüpft (Abb. 36, Kapitel 5.5.2) und in die Bindetasche der *Z. mobilis* TGT eingedockt (Kapitel 5.5.3). Die meisten der aufgeführten Thiole sind in verschiedenen tautomeren Formen denkbar (Tab. 26, Kapitel 5.5.1). Dabei ist mit der Umlagerung des Protons eine Änderung des Donor-Akzeptor-Musters verbunden, die beim Docking berücksichtigt werden muß. Für jede tautomere Form der einzelnen Leitstruktur-Derivate wurden 100 FlexX-Lösungen erzeugt und mit der Scoring-Funktion DrugScore (Kapitel 4.6.2) bewertet. Die zehn Docking-Lösungen mit den höchsten Bewertungen aus DrugScore enthielten fast alle das 5-Aminophthalsäurehydrazid-Fragment in einer Position, die dem experimentellen Bindungsmodus in TGT-**24** entspricht.

Ein Docking und eine anschließende Bewertung der FlexX-Lösungen mit DrugScore wurde auch mit acht Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT durchgeführt, für die in dieser Arbeit experimentelle K_i-Werte gemessen wurden (Tab. 27, Kapitel 5.5.3). Die experimentell gefundenen Bindungspositionen der fünf Inhibitoren, für die eine Kristallstruktur vorlag, wurde ebenfalls mit DrugScore bewertet. Dabei stimmten die Bewertungen mit DrugScore der experimentell gefundenen und mit FlexX gedockten Bindungspositionen gut überein (Tab. 27, Kapitel 5.5.3). Die Abweichungen der DrugScore-Bewertung aufgrund der experimentellen bzw. durch FlexX erzeugten Bindungsmodi betrugen maximal 7 % im Fall von 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**47**). Vermutlich resultieren die einzelnen Abweichungen aus kleinen Unterschieden der Bindungsgeometrie des Liganden in der experimentellen und der gedockten Position. Die Bindungsposition in der Kristallstruktur wird durch zusätzlich gebundene Wassermoleküle beeinflusst, die in der zum Docking verwendeten Bindetasche jedoch nicht berücksichtigt wurden. Aufgrund der guten

Übereinstimmung der mit DrugScore berechneten Affinitäten für die aus der Kristallstruktur bzw. aus FlexX entnommenen Bindungsgeometrien wurden diese mit den experimentellen pK_i -Werten der acht Inhibitoren korreliert (Abb. 37, Kapitel 5.5.3). Für sieben Inhibitoren lag die Standardabweichung zwischen dem berechneten und gemessenen pK_i -Wert bei 0,64 logarithmischen Einheiten. Die berechnete Affinität (pK_i calc.) von 8-(N-Acetylamino)-5-aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid (**55**) lag mit 6,17 deutlich (> 1 log-Einheit) über dem experimentellen Wert ($pK_i = 5,03$). Diese Verbindung wurde daher in der Korrelation nicht berücksichtigt. Für die FlexX-Lösungen der 20 Thiol-Derivate in ihren möglichen tautomeren Formen wurden mit dieser Korrelation pK_i -Werte berechnet, die zwischen 5,70 und 6,85 lagen. Daraus berechnen sich K_i -Werte im unteren mikromolaren Bereich (2 bis $0,1 \mu\text{M}$). Der experimentelle K_i -Wert der unsubstituierten Leitstruktur liegt bei $8,3 \mu\text{M}$ ($pK_i = 5,08$). Für alle 20 Thiole sind daher unter den FlexX-Lösungen der Leitstruktur-Derivate Vorschläge zu finden, die eine verbesserte Bindungsaffinität auf Grundlage der Bewertungen mit DrugScore erwarten lassen.

Die Thiol-Derivate für den dritten Design-Zyklus wurden zunächst unter dem Aspekt der synthetischen Realisierbarkeit betrachtet. Von den 14 kommerziell erhältlichen Verbindungen wurden die drei Nitroso-Derivate **61**, **62** und **64** sowie das Cyano-Derivat **68** als mögliche Substituenten ausgeschlossen. In diesen Fällen können Nebenreaktionen bei der Umsetzung mit Zinn(II)chlorid bzw. Hydrazin nicht ausgeschlossen werden. Aus den übrigen Verbindungen wurden schließlich die 6-Ring-Thiole **63** und **72**, sowie die 5-Ring-Thiole **73** und **75** ausgewählt (Kapitel 5.5.4). Mit diesen Verbindungen wurden Docking-Lösungen erhalten, die günstige Wechselwirkungen der Thiol-Reste in der polaren Tasche zeigten (Abb. 38 und 39, Kapitel 5.5.4). Allerdings konnte die Synthesevorschrift bislang nur für die beiden 5-Ring-Thiolen **73** und **75** erfolgreich umgesetzt werden. Die Reaktion der Thiole mit 3,5-Dinitrophthalsäureimid (**40**) nach der Methode von Fischer & Kvita (1985) erfolgt über eine nukleophile aromatische Substitution. Die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels sowie einer Base zur Deprotonierung des Thiols können daher für den Erfolg dieser Reaktion ausschlaggebend sein. Im Fall von 2,4-Diamino-6-mercaptopyrimidin (**63**) wurde die Umsetzung in Dioxan als Lösungsmittel und mit Triethylamin als Base versucht. Dabei könnte die geringe Löslichkeit von **63** und möglicherweise auch die geringe Basizität des Pyrimidin-Derivats verantwortlich für den Mißerfolg sein. Der pK_a -Wert für den Deprotonierungsschritt von 4,5-Diamino-2-mercaptopyrimidin, einer zu **63** verwandten Verbindung, wird mit 10,7 angegeben (Perrin, 1965). In der Arbeit von Fischer & Kvita (1985) wurden einige Thiole als Natriumsalze eingesetzt. Diese Variante wurde auch mit

4,5-Diamino-6-hydroxy-2-mercaptopyrimidin (**72**) versucht, jedoch konnte das gewünschte Produkt in einem ersten Versuch nicht isoliert werden (Hans-Dieter Gerber, pers. Mitteilung).



Die 5-Ring-Thiol-Derivate **79** und **80** wurden kristallographisch und kinetisch charakterisiert (Tab. 28, Kapitel 5.5.4). Überraschenderweise waren die Bindungsaffinitäten von **79** ($K_i = 54 \mu\text{M}$) und **80** ($K_i = 38 \mu\text{M}$) im Vergleich zu der unsubstituierten Leitstruktur **24** deutlich reduziert ($K_i = 8,3 \mu\text{M}$). Die Analyse der Kristallstrukturen der Verbindungen in Komplex mit der *Z. mobilis* TGT ermöglicht einige plausible Erklärungen für den Abfall der Affinitäten.

Das 5-Amino-3-(1H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-phthalsäurehydrazid (**79**) wird in der Kristallstruktur (Abb. 41, Kapitel 5.5.4) in einer Bindungsposition gefunden, die vergleichbar ist mit einer Docking-Lösung von FlexX (Abb. 39, Kapitel 5.5.3). In dieser FlexX-Lösung ist das 5-Aminophthalsäurehydrazid-Fragment analog wie die Leitstruktur **24** über H-Brücken zu Leu²³¹, Gly²³⁰, Gln²⁰³ und Asp¹⁵⁶ spezifisch gebunden. Im Vergleich zu **24** wird in der gedockten Struktur außerdem eine zusätzliche H-Brücke zwischen der N1'-H-Gruppe des Triazols und Asp²⁸⁰ gefunden. Mit DrugScore wurde die Bindungsaffinität ($\text{p}K_i \text{ calc.}$) dieser FlexX-Lösung mit 6,03 ($K_i = 1 \mu\text{M}$) vorhergesagt. Der experimentelle K_i -Wert ist damit um den Faktor > 50 höher ($K_i = 54 \mu\text{M}$) als der vorhergesagte Wert, der auf Grundlage der gedockten Position berechnet wurde (Kapitel 5.5.3). Wie durch FlexX vorhergesagt, ist der Triazol-Ring in der Kristallstruktur in die polare Tasche orientiert. Dabei befindet sich das N1'-Stickstoffatom in H-Brückenabstand zu beiden Carboxylatsauerstoffen von Asp²⁸⁰ (2,7 Å bzw. 3,3 Å). In dieser Bindungsposition müßte **79** als N1'-H-Tautomer vorliegen. Das N4'-Stickstoffatom wird in einem Abstand zu Asp¹⁰² (3,4 Å) gefunden, der einer schwachen H-Brücke entspricht. Diese H-Brückenbindung würde jedoch eine Protonierung am N4'-Stickstoff erfordern. In der neutralen Form des Triazols hingegen müßte unter der Voraussetzung einer H-Brücke von N4'-H zu Asp¹⁰² eine repulsive Wechselwirkung zwischen

dem N1'-Stickstoff und Asp²⁸⁰ resultieren. Aufgrund der Auflösung der Röntgenstruktur von TGT·**79** (2,1 Å) kann die Position der Protonen nicht lokalisiert werden. Einen Ausgangspunkt zur Abschätzung des Protonierungszustandes in der Proteinbindetasche liefert häufig der pK_a-Wert von Liganden in Wasser. Die pK_a-Werte von Liganden werden jedoch in der Umgebung der Proteinbindetasche aufgrund veränderter Dielektrizitätsverhältnisse beeinflusst.

Für das unsubstituierte 1,2,4-Triazol werden in der Literatur zwei pK_a-Werte (2,5 und 9,59) angegeben (Kapitel 5.5.5.1). Danach sollte **79** in saurer Lösung (pH < 2,5) wahrscheinlich protoniert und in alkalischer Lösung (pH > 9,59) einfach deprotoniert vorliegen. In der Puffer-Lösung (pH 8,5), die zum „Soaking“ (Kapitel 4.2.2) verwendet wurde, ist **79** vermutlich neutral. Der pK_a-Wert der Deprotonierung der N1'-H-Gruppe des Triazols (~ 9 - 10) müßte in Nachbarschaft einer Carboxylatgruppe (Asp²⁸⁰) in den alkalischen Bereich verschoben werden. Daher kann man eine H-Brücke zwischen der N1'-H-Gruppe und Asp²⁸⁰ in TGT·**79** annehmen.

Für das 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-phthalsäurehydrazid (**80**) in Komplex mit der TGT konnte eine hochaufgelöste Struktur (1,4 Å) am „Deutschen Elektronen Synchrotron“ (DESY) vermessen werden (Abb. 42, Kapitel 5.5.4). Das 5-Aminophthalsäurehydrazid-Fragment ist dabei in einer analogen Position wie **79** bzw. die unsubstituierte Leitstruktur **24** gebunden. Eine eindeutige Orientierung des 5-Amino-1,2,4-triazol-Restes konnte jedoch nicht aus der Form der positiven |F_o-F_c|-Dichte entnommen werden (Abb. 42, Kapitel 5.5.4).

Das 5-Amino-3-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-phthalsäurehydrazid (**80**) wurde aus wäßriger Lösung (pH 8,5) kristallisiert und die Struktur aufgeklärt (Kapitel 5.5.5.2). In der Kristallstruktur werden drei Protonen am Triazol-Ring gefunden, wobei eines am N1'-Stickstoffatom lokalisiert und die beiden anderen der 5'-NH₂-Gruppe zugeordnet sind (Abb. 45, Kapitel 5.5.5.2). In einer theoretischen Studie wurde die Tautomerie von 3-Amino-1,2,4-triazol in der Gasphase und in wäßriger Lösung untersucht (Parchment *et al.*, 1992). In einem der verwendeten *ab initio*-Modelle wurde das N2H-Tautomer (entsprechend das N1'-H-Tautomer von **80**) als stabilste Form vorhergesagt. Das N1H-Tautomer wird nach diesem Modell mit einer etwas höheren Energie (0,4 kcal/mol) bewertet. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit ¹⁵N-NMR-Messungen, die ein Verhältnis zwischen den tautomeren Formen N2H und N1H von 2:1 zeigen. Das N4H-Tautomer (entsprechend das N4'-H-Tautomer von **80**) ist der ¹⁵N-NMR-Studie zufolge im Rahmen der Meßgenauigkeit

nicht populierte und wird in dem *ab initio*-Modell mit einer höheren Energie (7 kcal/mol) bewertet.

Die potentiometrische Titration der zu **80** strukturanalogen Verbindung 5-Amino-3-methylmercapto-1H-[1,2,4]triazol ergab zwei pK_a -Werte (3,28 und 9,79). Damit würde erst im deutlich alkalischen Bereich (pH 9 - 10) eine Deprotonierung bzw. im sauren Bereich (pH 3 - 4) eine Protonierung von **80** erfolgen. Daher liegt **80** in der Lösung des „Soaking“-Puffers in der neutralen Form und wahrscheinlich überwiegend als N1'-H-Tautomer vor. Mit dieser tautomeren Form ergibt sich eine FlexX-gedockte Lösung (Abb. 39, Kapitel 5.5.3), in der H-Brücken zwischen der N1'-H- (2,7 Å) bzw. 5'-NH₂-Gruppe (2,5 Å) des Triazol-Restes und Asp²⁸⁰ vorliegen. Für diese FlexX-Lösung wurde mit DrugScore eine Bindungsaffinität (pK_i calc.) von 6,14 ($K_i = 0,7 \mu\text{M}$) erhalten. Wie bei **79** ist jedoch der experimentelle K_i -Wert von **80** deutlich höher ($K_i = 38 \mu\text{M}$) als der vorhergesagte Wert der FlexX-Position (Kapitel 5.5.3). In der Kristallstruktur von **80** findet man für die C3-S-C3'-Bindung einen Winkel von 101,8° (Abb. 45, Kapitel 5.5.5.2). Das Kraftfeld-minimierte Strukturmodell von **75c**, welches für das Docking mit FlexX verwendet wurde (Abb. 39, Kapitel 5.5.3), enthält an dieser Position jedoch einen deutlich kleineren Bindungswinkel (96,2°). In der modellierten Struktur erreicht der Triazol-Ring damit eine Geometrie, die zu einer optimalen Ausrichtung gegenüber Asp²⁸⁰ führt. Auch das 5-Aminophthalsäurehydrazid-Gerüst zeigt in diesem Modell gute Wechselwirkungen über H-Brücken zu den benachbarten Aminosäuren (Leu²³¹, Gly²³⁰, Gln²⁰³ und Asp¹⁵⁶). In der Kristallstruktur von TGT·**80** ist dieses Basisfragment jedoch deutlich aus seiner günstigen Bindungsposition herausgedreht (Abb. 44, Kapitel 5.5.3). Aufgrund des größeren Winkels der C3-S-C3'-Bindung wird der Triazol-Ring in eine Position gebracht, in der eine optimale Wechselwirkung beider Donor-Gruppen (N1'-H bzw. 5'-NH₂) mit Asp²⁸⁰ nicht möglich ist. Unter Berücksichtigung der Kristallstrukturen von TGT·**80** und **80** wurden zwei alternative Konformationen des 5-Amino-1,2,4-triazol-Ringes modelliert (Abb. 43, Kapitel 5.5.3). Die 5'-NH₂-Gruppe ist in diesen Modellen zu Asp²⁸⁰ bzw. der Carbonylgruppe von Asn⁷⁰ orientiert. Weiterhin unterscheiden sich beide Konformationen durch die angenommene tautomere Form (N'1H bzw. N'2H). Der Studie von Parchment *et al.* (1992) zufolge sollten zwischen beiden Tautomeren jedoch keine großen Energieunterschiede (0,4 kcal/mol) existieren. In den modellierten Orientierungen liegen jeweils zwei mögliche attraktive Wechselwirkungen zwischen den Donor-Gruppen (5'-NH₂ und N'1H bzw. N'2H) und dem Protein vor. Bei diesen potentiellen H-Brückenkontakten ist jedoch lediglich der geometrische Abstand zwischen H-Donor- und H-Akzeptoratom als Kriterium berücksichtigt worden. Die Kontaktgeometrien eines H-Donors in der Umgebung einer Carbonylgruppe

zeigen eine räumliche Verteilung, in der bestimmte Orientierungen deutlich bevorzugt sind (Klebe, 1994). In dem vorgestellten Modell können die H-Donoren des 5-Amino-1,2,4-triazol-Rings keine optimalen Kontaktgeometrien ausbilden, die starke H-Brücken zu den Akzeptor-Gruppen (Asp²⁸⁰, Asp¹⁰² und Asn⁷⁰) ermöglichen. Außerdem liegt in beiden Modellen jeweils eine repulsive Wechselwirkung zwischen zwei sich gegenüberstehenden Akzeptor-Gruppen vor (Abb. 43, Kapitel 5.5.3). Die beiden modellierten Orientierungen legen nahe, daß der 5-Amino-1,2,4-triazol-Ring offensichtlich kein optimales H-Brückenmuster in der polaren Tasche ausbilden kann. Die beobachtete Unordnung der positiven $|F_o - F_c|$ -Dichte von TGT·**80** (Abb. 42, Kapitel 5.5.4) steht im Einklang mit alternativen Wechselwirkungsmustern des Triazols, mit denen offensichtlich keine optimalen H-Brücken erreicht werden. Die leicht erhöhte Bindungsaffinität von **80** ($K_i = 38 \mu\text{M}$) im Vergleich zu **79** ($K_i = 54 \mu\text{M}$) kann auf Grundlage der ungeordneten Kristallstruktur von TGT·**80** jedoch nicht schlüssig erklärt werden. Aufgrund des größeren Fehlers ($14 \mu\text{M}$) bei der Affinitätsbestimmung von **79** sollten diese Unterschiede jedoch eher vorsichtig interpretiert werden.

Durch eine Überlagerung anhand der Koordinaten aller Hauptkettenatome („Ca-fit“) ist eine deutliche Verdrehung des 5-Aminophthalsäurehydrazid-Gerüsts in den Komplexen von TGT·**24**, TGT·**47**, TGT·**53**, TGT·**79** und TGT·**80** zu erkennen (Abb. 44, Kapitel 5.5.4). Daher resultiert die Einführung des Triazol-Restes in der 6-Position von **24** in einer Schwächung der H-Brücke zwischen der 5-NH₂-Gruppe und Leu²³¹ in der Abfolge TGT·**24** ($2,8 \text{ \AA}$), TGT·**47** ($2,9 \text{ \AA}$), TGT·**53** ($2,8 \text{ \AA}$), TGT·**79** ($3,2 \text{ \AA}$) und TGT·**80** ($3,4 \text{ \AA}$). Dies liefert eine weitere Erklärung für den Abfall der Bindungsaffinitäten von **79** und **80** ($54 \mu\text{M}$ bzw. $38 \mu\text{M}$) gegenüber **24**, **47** und **53** ($K_i = 8,3 \mu\text{M}$ bzw. $0,2 \mu\text{M}$ bzw. $0,3 \mu\text{M}$).

Ein ähnliches Verhalten konnte für eine Serie von Inhibitoren der Purin Nukleosid Phosphorylase (PNP, Kapitel 6.2) gefunden werden (Erion *et al.*, 1993). In dem Enzym wurden 7-Deazaguanin-Derivate untersucht, die an der 7-Position einen aromatischen oder alizyklischen Substituenten enthielten. Die 5-NH-Gruppe dieser Verbindungen war über eine H-Brücke zu Asn²⁴³ orientiert, der Substituent in 7-Position füllte eine hydrophobe Tasche (Tyr⁸⁸, Phe¹⁵⁹, Phe²⁰⁰ und His²⁵⁷) im Bereich der Ribose-Bindungsstelle (Abb. 52). Mit einem Cyclohexyl-Substituenten (**97**) ergaben sich gute Wechselwirkungen in der hydrophoben Tasche und eine Bindungsaffinität von $1,3 \mu\text{M}$. Die Verlängerung des Substituenten durch eine zusätzliche Methylengruppe zu dem entsprechenden 7-(Cyclohexylmethyl)-Derivat **98** erbrachte eine Affinitätssteigerung um den Faktor 30 ($K_i = 0,047 \mu\text{M}$). Die reduzierte Bindungsaffinität von **97** gegenüber **98** ist auf eine Schwächung der H-Brücke zwischen der

5-NH-Gruppe des 7-Deazaguanin-Gerüsts und Asn²⁴³ zurückzuführen. Der Cyclohexyl-Rest nimmt in beiden Komplexen eine vergleichbare Bindungsposition ein, jedoch kann nur mit **98** eine optimale Bindungsposition für das 7-Deazaguanin-Gerüst erreicht werden.

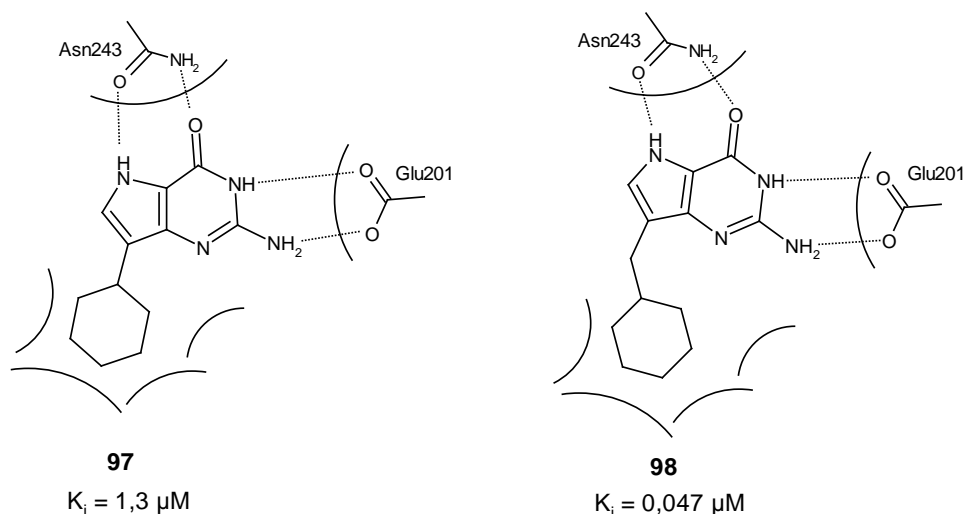


Abb. 52: Bindung von 7-Cyclohexyl-7-deazaguanin (97**) und 7-(Cyclohexylmethyl)-7-deazaguanin (**98**) im aktiven Zentrum der Purin Nukleosid Phosphorylase (PNP).** In Komplex mit **97** ist die H-Brücke zwischen der 5-NH-Gruppe des 7-Deazaguanins und Asn²⁴³ durch die Wechselwirkung des Cyclohexyl-Restes in der hydrophoben Tasche geschwächt. Durch eine zusätzliche Methylengruppe in **98** kann die Bindungsaffinität ($K_i = 0,047 \mu\text{M}$) im Vergleich zu **97** um den Faktor 30 gesteigert werden. Aufgrund des verlängerten Cyclohexylmethyl-Substituenten in der hydrophoben Tasche wird eine optimale H-Brückenposition zwischen der 5-NH-Gruppe und Asn²⁴³ erreicht werden.

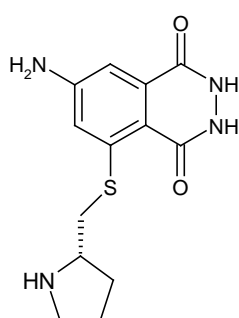
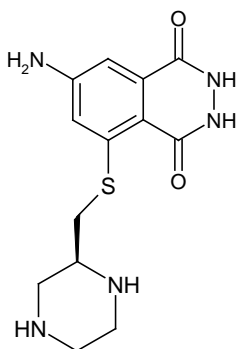
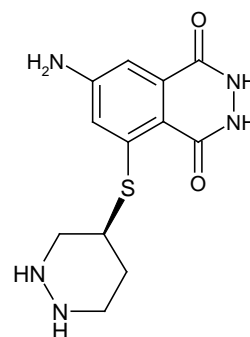
6.4.3 Vorschläge für weitere Design-Zyklen

Mit den Erkenntnissen des dritten Design-Zyklus wurden einige alternative Thiol-Derivate vorgeschlagen, die möglicherweise günstigere Wechselwirkungen zu den polaren Aminosäure-Resten der Bindetasche ausbilden könnten (Kapitel 5.6). In den Komplexen TGT-**79** und TGT-**80** ist das 5-Aminophthalsäurehydrazid-Gerüst deutlich aus der optimalen Bindungsposition herausgedreht (Kapitel 6.4.2). Diese Position sollte durch Einführung von Thiol-Derivaten in der 3-Position möglichst erhalten bleiben. Wie auch das Beispiel der PNP (Abb. 52, Kapitel 6.4.2) zeigt, können kleinere Änderungen des H-Brückenmusters zu deutlichen Abnahmen in der Bindungsaffinität führen. Weiterhin sollten die angefügten Thiol-Derivate H-Donoren in einer Position enthalten, die eine geometrisch günstige

Ausrichtung zu möglichst allen benachbarten polaren Aminosäuren Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ erlaubt. Die bislang untersuchten planaren 1,2,4-Trizole sind offensichtlich nicht in der Lage, ausschließlich attraktive Wechselwirkungen in diesem Bereich der Bindetasche auszubilden (Kapitel 6.4.2). Durch Verknüpfung der 3-Thiol-Gruppe mit einem tertiären C-Atom als Strukturelement eines alternativen Substituenten sollte hingegen eine bessere Geometrie erreicht werden können (Abb. 46, Kapitel 5.6). Dazu geeignete Substituenten würden die Strukturelemente S-CH₂-X bzw. S-CH-YZ enthalten, wobei X ein Ringsubstituent bzw. YZ Bestandteile eines Ringes sind. Einige auf den ersten Blick synthetisch gut zugängliche Vorschläge für solche Thiol-Derivate konnten in der Beilstein-Datenbank gefunden werden (Kapitel 5.6.1). Berücksichtigt wurden dabei 5- und 6-Ring-Thiole mit mindestens einer H-Donor-Funktion. Aufgrund der relativen räumlichen Ausrichtung der Seitengruppen von Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ zueinander erscheinen alizyklische 5- oder 6-Ringe als geeignete Strukturelemente. Im Vergleich zu den planaren 5- oder 6-Ringen sind mit Alizyklen geeignete Wechselwirkungen insbesondere zu Asp¹⁰² und Asp²⁸⁰ denkbar (Abb. 46, Kapitel 5.6). Zur Einschränkung der Zahl möglicher Stereozentren sollte die H-Donor-Funktion außerdem Bestandteil des Ringes sein. Daher konzentrierte sich die Suche auf 5- bzw. 6-Ring-Thiole, die mindestens eine NH-Gruppe im Ring enthalten. Als Vorschläge für Methylthiol-Derivate (Strukturelement S-CH₂-X) konnten z.B. Pyrrolidin-2-methanthiol (**85**) und Piperazin-2-methanthiol (**87**) gefunden werden. Ein Beispiel für das Strukturelement S-CH-YZ ist das 4-Piperidazinthiol (**90**). Eine stereoselektive Synthese für das (S)-Stereoisomer von **85**, das (S)-Pyrrolidin-2-methanthiol (**86**), ist in der Literatur beschrieben (Schwenkkraus & Otto, 1990). In einer Docking-Studie mit FlexX zeigt der entsprechende Strukturvorschlag (**86**) eine H-Brücke zwischen der Pyrrolin-NH-Gruppe und Asp²⁸⁰ (Abb. 47, Kapitel 5.6.2). Die mit DrugScore vorhergesagte Bindungsaffinität dieser Docking-Position (pK_i calc. = 6,57) läßt eine gute Wechselwirkung erwarten.

Auch für die Verbindungen **87** und **90** in Form ihrer (S)-Stereoisomere werden Docking-Lösungen mit guten Bindungsaffinitäten (**87**: pK_i calc. = 6,80; **90**: pK_i calc. = 6,50) vorhergesagt. In dem vorgeschlagenen Bindungsmodus von **87** können verbrückende Wechselwirkungen der NH-Gruppen zu allen drei Aminosäuren Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ gefunden werden, während die Hydrazin-Gruppe von **90** H-Brücken zu Asp²⁸⁰ ausbildet (Abb. 48, Kapitel 5.6.2). Für beide Fälle konnte jedoch keine stereoselektive Synthese in der Beilstein-Datenbank gefunden werden. Möglicherweise kann in diesen Fällen zunächst das Racemat im Enzymassay getestet und durch „Soaking“ der Bindungsmodus und die Stereochemie des aktiven Enantiomers bestimmt werden. Falls die Kristallstruktur eine

Zuordnung des bevorzugt gebundenen Stereoisomers zuläßt, sollte anschließend eine Racematspaltung versucht werden.

**86** pK_i (calc.) = 6,57**87** pK_i (calc.) = 6,80**90** pK_i (calc.) = 6,50

In allen drei angesprochenen Vorschlägen wird das 5-Aminophthalsäurehydrazid-Fragment in einer optimalen Bindungsposition zu den Aminosäuren Leu²³¹, Gly²³⁰, Gln²⁰³ und Asp¹⁵⁶ gefunden. Aufgrund des basischen Charakters von Pyrrolidin- und Piperazin-Derivaten (Pyrrolidin: pK_a -Wert 11,35) kann zudem erwartet werden, daß **86** und **87** bei den Enzymassay- und „Soaking“-Bedingungen (pH 8,5) protoniert vorliegen. Die Bindungsaffinität dieser Verbindungen in protonierter Form sollte aufgrund möglicher Salzbrücken zu den deprotonierten Carboxylatgruppen von Asp¹⁰² und Asp²⁸⁰ einen wichtigen Beitrag zur Gesamtaffinität leisten.

6.5 Therapeutisches Potential der TGT und der bisherigen Inhibitoren

Die tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) greift mit in die Expression der Virulenzfaktoren des humanpathogenen Bakteriums *Shigella* ein, das die Ruhrerkrankung auslöst (Kapitel 2.2.2). Es wurde gezeigt, daß die Mutation des *tgt*-Gens in allen vier Bakterien-spezies der Gattung *Shigella* zu einer signifikanten Abnahme der phänotypischen Virulenz führt (Durand et al., 1994; Durand et al., 2000). Inhibitoren der TGT sollten daher in der Lage sein, die Virulenz von *Shigellae* zu unterdrücken. Sie stellen somit einen neuen Ansatzpunkt für die Therapie der Bakterienruhr dar. Eine Analyse der bekannten *tgt*-Sequenzen aus pro- und eukaryotischen bzw. archaeobakteriellen Organismen läßt auf ein homologes Faltungsmuster aller aufgeführten TGTs schließen (Romier et al., 1997). Dabei sind die *tgt*-Gene von *S. flexneri* und *Escherichia coli* nahezu identisch (99,2 % Sequenzhomologie). Die *tgt*-Sequenzen von *S. flexneri* und *Zymomonas mobilis* sind zu 55,2 % homolog zueinander. Die Sequenzanalyse aller bekannten *tgt*-Sequenzen zeigt wiederum, daß die an der preQ₁-Bindung (Asp¹⁵⁶, Gln²⁰³, Gly²³⁰ und Leu²³¹) und Katalyse (Asp¹⁰² und Ser¹⁰³) beteiligten Aminosäuren hochkonserviert sind. Im aktiven Zentrum ist lediglich das Tyr¹⁰⁶ der *Z. mobilis* TGT durch einen Phenylalanin-Rest in allen anderen TGTs ersetzt. Damit ist die Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT als Strukturmodell für das *de novo*-Design von Inhibitoren der *S. flexneri* auf jeden Fall geeignet. Andererseits muß in diesem Zusammenhang diskutiert werden, ob Inhibitoren der *S. flexneri* TGT auch eine Affinität zur humanen TGT zeigen könnten. Damit verbunden ist auch die Frage nach möglichen Nebenwirkungen von TGT-Inhibitoren im menschlichen Organismus.

Der biologische Effekt eines Queuosin-Mangels (Q), der mit einer Inhibition der TGT einhergeht, ist bei einigen pro- und eukaryotischen Organismen untersucht worden. In *E. coli* führt ein Q-Mangel zu einem früheren Absterben der Zellen in der stationären Phase einer Kokultur mit Wildtyp-Zellen (Noguchi et al., 1982). Außerdem zeigen Q-Zellen von *E. coli* eine höhere Proteinsynthese-Rate in der Wachstumsphase verglichen mit dem Wildtyp von *E. coli*, nachdem für eine gewisse Zeit das Nährmedium entzogen wurde (Slany & Kersten, 1994). Durch Q-Mangel in *E. coli* erhöht sich die Fehlerrate bei der Erkennung des UAG Stop-Kodons (Frey et al., 1989). Analog zu anderen modifizierten tRNA-Basen scheint das Queuosin an der Feinregulierung der Translation beteiligt zu sein (Bienz & Kubli, 1981).

In eukaryotischen Zellen wird Queuosin mit der Nahrung aufgenommen und von der TGT in einem Katalyseschritt in die tRNA eingebaut (Kapitel 2.3.1). Eine deutliche Reduktion der Kodon-Präferenz *in vivo* kann durch Q-Modifikation in tRNA^{His} demonstriert werden (Meier

et al., 1985). Das Queuosin ist auch an der ribosomalen Verschiebung des Leserahmens (Frameshift) in Retroviren (Carlson *et al.*, 1999) und Eukaryoten (Marczinke *et al.*, 2000) beteiligt. Ein Q-Mangel wird in kultivierten Adenokarzinom-Zellen des Menschen gefunden, der auf eine Abschaltung des *tgt*-Gens zurückzuführen ist (Gunduz *et al.*, 1992). Die genaue biologische Funktion von Queuosin in eukaryotischen Zellen ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Auffällig ist aber eine Beteiligung an unterschiedlichen zellulären Prozessen wie z.B. Differenzierung, Wachstum und metabolischer Regulation (Dirheimer *et al.*, 1995). Mögliche Nebenwirkungen aufgrund einer Inhibition der humanen TGT in Zusammenhang mit einer Therapie der Bakterienruhr können aus diesen Studien jedoch nur schwer abgeschätzt werden. Für die in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß sie sowohl an die bakterielle TGT von *S. flexneri* als auch an die humane TGT binden. Der am stärksten affine Inhibitor aus dem bislang durchgeführten strukturbasierten Design ist 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**53**, $K_i = 0,2 \mu\text{M}$). Diese Verbindung wechselwirkt in der Bindetasche mit Aminosäuren (Asp¹⁵⁶, Gln²⁰³, Gly²³⁰ und Leu²³¹), die in allen TGT-Sequenzen konserviert sind. Aufgrund der Substratspezifität für Queuine ist die Bindetasche der eukaryotischen TGTs vermutlich deutlich vergrößert. Der 4S,5R-Dihydroxy-2-cyclopenten-1S-yl-Rest des Queuins könnte in einem erweiterten Bereich der preQ_i-Tasche Platz finden, der durch den Austausch von Valin-233-Glycin bzw. Cystein-158-Valin in eukaryotischer TGT (z.B. von der Maus) entsteht (Romier *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurden ebenfalls erweiterte Derivate vorgestellt, die in der zur Leitstruktur **24** benachbarten polaren Tasche binden könnten (Kapitel 6.4). Die entsprechenden Aminosäuren (Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰) in diesem Bereich sind jedoch auch in allen TGTs konserviert. Ein weiteres Ziel muß daher zunächst sein, erweiterte Leitstruktur-Derivate zu erhalten (Kapitel 5.6), die in diesem Bereich der Tasche wechselwirken. Ausgehend von der Kristallstruktur dieser Verbindungen in Komplex mit der TGT könnte der Bindungsmodus in der humanen TGT modelliert werden. Die Identifikation von unbesetzten Taschen in der bakteriellen TGT, die in der humanen TGT aufgrund subtiler Sequenzunterschiede nicht vorliegen, könnte zur Modellierung spezifischer Inhibitoren verwendet werden.

Die Bakterienruhr wird derzeit mit Antibiotika therapiert, die aufgrund der zunehmenden Verbreitung resistenter Stämme häufig in Kombination eingesetzt werden müssen. So werden für Stämme des Typs *S. dysenteriae* Typ I bereits Resistenzen gegen Ampicillin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Trimethoprim und Sulphamethoxazol gefunden (Chopra *et al.*, 1997) (Mates *et al.*, 2000). Infektionen mit diesem Typus verursachen in Entwicklungsländern die epidemische Form der Erkrankung, die einen besonders schweren Verlauf und häufig einen

tödlichen Ausgang nimmt (Dehio, 1998). Die Shigellen sind im allgemeinen hochinfektiös, da bereits 10 bis 100 Bakterien zu einer Erkrankung führen können. Die Inkubationszeit variiert dabei, in Abhängigkeit vom Ernährungszustand, zwischen 6 und 72 Stunden. In einer Studie wurden Patienten mit verschiedenen Dosen Ciprofloxacin behandelt, die mit *S. dysenteriae* Typ I infiziert waren (Bennish *et al.*, 1992). Dabei erwies sich eine Behandlung als besonders effektiv, in der alle 12 Stunden eine Dosis von 500 mg Ciprofloxacin über einen Zeitraum von 5 Tagen verabreicht wurde.

Zur Therapie der Bakterienruhr auf Basis der TGT-Inhibition müßte somit wahrscheinlich ein potentieller Wirkstoff über längere Zeit verabreicht werden. Der Wirkstoff müßte auf oralem Wege in den Darm gelangen und die Invasion der Shigellen in die Epithelzellen des Dickdarms unterbinden. Möglicherweise könnte die gewünschte Unterdrückung der Pathogenität durch gleichzeitigen Angriff auf mehrere Wirkorte erhöht werden. Dazu würde sich die tRNA N⁶-Isopentyladenosin (i⁶A37) Synthetase, das Produkt des *miaA*-Gens (Durand *et al.*, 1997; Durand *et al.*, 2000), als ein weiteres Target anbieten. Der Effekt einer Mutation dieses Gens ist in allen vier *Shigella* Spezies mit einer drastischen Reduktion der Pathogenität verbunden (Kapitel 2.2.2). Durch Unterdrückung der bakteriellen Invasion über einen ausreichend langen Zeitraum würde dem körpereigenen Immunsystem die Möglichkeit gegeben, der Infektion entgegenzuwirken. Schließlich ist die Ausbreitung des Erregers auch deshalb so effektiv, weil sie in den Darmepithelzellen stattfindet, ohne zwischenzeitlich ein weiteres extrazelluläres Stadium zu durchlaufen (Dehio, 1998).

Bei der oralen Verabreichung des Wirkstoffes würde eine Resorption über die Schleimhaut des Dünndarms oder die Magenschleimhaut erfolgen. Sobald der Wirkstoff den Magen-Darm-Trakt verlassen hat, wird er im Blutstrom zur Leber transportiert und metabolisiert. Bei der Metabolisierung von Wirkstoffen wird eine Einteilung in die Phase-I- und Phase-II-Reaktionen vorgenommen. Phase-I-Transformationen umfassen Reaktionen, bei denen eine funktionelle Gruppe eingeführt oder freigelegt wird (z.B. durch Oxidation oder Hydrolyse) (Silverman, 1992). Bei den Phase-II-Transformationen entstehen stark polare Konjugate wie Gukuronide oder Schwefelsäureester, die aufgrund ihrer verbesserten Löslichkeit über die Niere ausgeschieden werden. In dieser Arbeit wurden affine Inhibitoren der TGT mit einem 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid- bzw. 5-Amino-3-thiol-phthalsäurehydrazid-Grundgerüst identifiziert. In der Phase-I-Transformation würden vermutlich enzymatische Oxidationen an der Aminogruppe und am Schwefelatom stattfinden. Primäre aromatische Amine können von S-Adenosylmethionin-abhängigen Amino-N-Methyltransferasen N-methyliert werden. Die gebildeten sekundären Arylamine sind wiederum Substrate der Flavin-Monooxygenasen und

werden dabei zu primären Hydroxylaminen überführt. Oxidationen von Kohlenstoff-Schwefel-Systemen zu Sulfoxiden werden sowohl von der Flavin-Monooxygenase als auch durch Cytochrom P-450 katalysiert. In der Phase-II-Transformation kann die primäre aromatische Aminogruppe mit Glukuronsäure zu einem N-Glukuronid konjugiert werden. Die Acetylierung eines Amins wird in der Leber von einer N-Acetyltransferase katalysiert, wobei die Acetylgruppe von Acetyl-CoenzymA geliefert wird. Auch die Hydrazidgruppe von **24** und Strukturanaloga könnte auf diese Weise acetyliert werden.

6.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit identifizierte Leitstruktur 4-Aminophthalsäurehydrazid (**24**) liefert die Basis für das weitere strukturbasierte Design von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT). Eine Synthesemethode zur Derivatisierung dieser Leitstruktur (Kapitel 5.4) hat zu Verbindungen mit einer höheren Bindungsaffinität geführt, die z.T. auch strukturell charakterisiert werden konnten. Darunter ist das 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid (**54**) der bislang affinste kompetitive Inhibitor ($K_i = 0,2 \mu\text{M}$). Die Einführung von 1,2,4-Triazolen über eine Thiol-Funktion in 3-Position hat gezeigt, daß zur Erweiterung der Leitstruktur die benachbarte polare Tasche von **24** besetzt werden kann (Kapitel 5.5). Aufgrund der Erkenntnisse dieses dritten Design-Zyklus wurden Thiol-Derivate mit möglicherweise verbesserten Bindungseigenschaften in dieser polaren Region vorgeschlagen. Die Entwicklung der Synthese dieser Verbindungen sollte daher konsequent weiterverfolgt werden. Methoden zur Strukturbestimmung der TGT-Inhibitor-Komplexe sowie zur Affinitätsbestimmung sind in dieser Arbeit etabliert bzw. weiterentwickelt worden (Kapitel 4.1.8 und 4.2.2). Daher können in kurzer Zeit Aussagen in Bezug auf den experimentellen Bindungsmodus und die Affinitätsänderung neuer Leitstruktur-Derivate erhalten werden. Ein alternativer Bindungsassay auf Basis von Fluoreszenz-Messungen (Kapitel 6.1.2) kann eventuell mit der erzeugten Tryptophan-Mutante entwickelt werden. Mit dieser Methode könnten Bindungskonstanten zwischen der TGT und Inhibitoren in Abwesenheit der tRNA gemessen werden. Möglicherweise könnten so Aussagen über den Mechanismus der Inhibition erhalten werden, z.B. warum eine Präinkubation der Inhibitoren mit dem Enzym erforderlich ist (Kapitel 5.3.2.2). Aufgrund zahlreicher Fehlerquellen bei der Interpretation der Meßsignale (Kapitel 6.1.2) ist die Entwicklung dieser Methode jedoch sicherlich eine große Herausforderung.

Wenn Inhibitoren mit einer hohen Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich zur Verfügung stehen, muß ihre biologische Wirksamkeit in einem *in vivo*-Test überprüft werden. Dabei wird die Invasionsfähigkeit der Shigellen in HeLa-Zellen verfolgt (Adam et al., 1996). Erste Kontakte mit der Arbeitsgruppe von Dr. Adam (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität, Charité, Berlin), die sich schon viele Jahre mit Shigellen und dem Virulenz-Assay beschäftigen, sind bereits aufgenommen worden.

7 Zusammenfassung

Eubakterielle tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) ist an der Biosynthese des hypermodifizierten tRNA-Nukleosids Queuosin (Q, 7-(4S,5R-Dihydroxy-2-cyclopenten-1S-yl-aminomethyl)-7-deazaguanosin) beteiligt. Dabei katalysiert die TGT den spezifischen Austausch von Guanin-34 im tRNA-Antikodon gegen die Q-Vorstufe preQ₁ (7-Aminomethyl-7-deazaguanin). Das Guanin-34 befindet sich in der sogenannten Wobble-Position von tRNAs mit der Sequenz GUN (N = eines der vier RNA-Nukleotide). Aus dieser Vorstufe wird in zwei weiteren Biosynthese-Schritten die hypermodifizierte tRNA-Base Queuosin gebildet. In einer *tgt*-Mutanten des humanpathogenen Bakteriums *Shigella flexneri* wurde ein deutlich verminderter Gehalt an Virulenz-spezifischen Proteinen gefunden. Ein Queuosin-Mangel führt somit zu einer signifikanten Reduktion der phänotypischen Virulenz von *S. flexneri*. Bakterienspezies der Gattung *Shigella* (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* und *S. boydii*) sind als Erreger der Ruhrerkrankung weltweit verbreitet. An den Folgen der Shigellenruhr sterben jährlich 600.000 Menschen, darunter in der Mehrzahl Kleinkinder in Entwicklungsländern. Die Therapie der Bakterienruhr mit Antibiotika ist häufig durch das Auftreten multiresistenter Stämme erschwert und auch eine Impfung steht zur Zeit noch nicht zur Verfügung. Daher sind neue Ansätze zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen die Ruhrkrankheit ein lohnendes Forschungsziel. Die Inhibition der TGT könnte eine neue Möglichkeit zur Therapie dieser Krankheit eröffnen.

In der vorliegenden Arbeit wurden erste Schritte für den rationalen Entwurf (*de novo*-Design) von neuen TGT-Inhibitoren durchgeführt, die sich wesentlich von den bisher bekannten Substrat-Analoga unterscheiden. Die Methoden des strukturbasierten Designs von Wirkstoffen sind in der modernen Pharmaforschung kaum noch wegzudenken. Viele Arzneistoffe wirken als Inhibitoren von Enzymen bzw. Agonisten oder Antagonisten von Rezeptoren. Die Inhibition verlangt eine sterische und physikochemische Komplementarität der Wirkstoffe mit der Bindungstasche der Zielproteine. Damit ist die dreidimensionale (3D) Struktur eines Proteins, das am Krankheitsgeschehen beteiligt ist, häufig ein optimaler Ausgangspunkt für das strukturbasierte Design.

Die kürzlich (1996) aufgeklärte Kristallstruktur der TGT aus *Zymomonas mobilis* in Komplex mit dem Substrat preQ₁ lieferte die Basis für das strukturbasierte Inhibitor-Design in dieser Arbeit. Zunächst wurde versucht, durch kristallographische Charakterisierung von Substrat-Analoga in Komplex mit der TGT Aufschlüsse über die Bindungsspezifität des Enzyms zu

erhalten. Von zehn getesteten Verbindungen gelang in zwei Fällen die Stukturaufklärung der TGT-Komplexe mit den Substrat-Analoga preQ₀ und 7-Methyl-preQ₁. Dazu wurden die Verbindungen in Kristalle der *Z. mobilis* TGT eindiffundiert („gesoakt“). Das preQ₁ bzw. die Substrat-verwandten Moleküle sind dabei in einer amphiphilen Bindetasche interkaliert. Spezifische Wechselwirkungen erfolgen über H-Brücken zu den Aminosäure-Resten von Asp¹⁵⁶, Gln²⁰³, Gly²³⁰ und Leu²³¹. Hydrophobe Interaktionen liegen zum Hydroxyphenyl-Ring von Tyr¹⁰⁶ (über π - π -Stapelung) und Cys¹⁵⁸ auf der einen Seite und zu Met²⁶⁰ auf der anderen Seite des 7-Deazaguanin-Gerüsts der Liganden vor. Das aktive Zentrum der TGT zeigt demnach ein Bindungsmotiv, wie es in analoger Form häufig bei GTP-bindenden Proteinen gefunden wird.

Im Rahmen einer früheren Mutationsstudie der TGT aus *Escherichia coli* ist eine weitere Aminosäure im aktiven Zentrum, das Ser¹⁰³, aufgefallen. Die Mutation dieser Aminosäure in einen Alanin-Rest führte in der *E. coli* TGT zu einer drastischen Reduktion der Enzymaktivität. Eine plausible Erklärung für diesen Effekt konnte anhand der Wildtyp-Struktur, in der Ser¹⁰³ über eine schwache H-Brücke mit preQ₁ wechselwirkt, jedoch nicht gegeben werden. In dieser Arbeit konnte eine Serin-103-Alanin-Mutante (S103A) der *Z. mobilis* TGT durch ortsspezifische Mutagenese hergestellt und sowohl biochemisch als auch kristallographisch charakterisiert werden. Die Kristallstruktur von TGT(S103A) in Komplex mit preQ₁ zeigt eine zur Wildtyp-TGT analoge Orientierung des Substrates in der Bindetasche. Außerdem konnte in TGT(S103A)-preQ₁ ein zusätzliches Wassermolekül im Bereich der Serin-103-Alanin-Mutation gefunden werden, das formal die OH-Funktion des Serin-Restes in TGT(S103A)-preQ₁ ersetzt. Dieses Wassermolekül übernimmt die Ausbildung einer H-Brücke zu der 2-NH₂-Gruppe von preQ₁. Interessanterweise deutet die Kristallstruktur von TGT(S103A)-preQ₁ auf eine größere Flexibilität des Substrates hin. Einen Hinweis dafür liefert die Beobachtung, daß die Temperaturfaktoren der Ligand-Atome im Vergleich zu den Aminosäure-Resten der Bindetasche deutlich erhöht sind. Darüber hinaus zeigt die 2F_o-F_c-Differenzelektronendichte der verfeinerten Struktur unterbrochene Bereiche für das preQ₁-Molekül. Dies ist vermutlich auf eine nur bedingte Fixierung zurückzuführen, die über die H-Brücke des neben Ala¹⁰³ eingelagerten Wassermoleküls zu der 2-NH₂-Gruppe von preQ₁ erreicht werden kann. Diese Fixierung hat aber vermutlich einen entscheidenden Einfluß auf die Basenaustausch-Reaktion der TGT. Nach einem postulierten Mechanismus erfolgt der Austausch des Guanins gegen preQ₁ in zwei konsekutiven S_N2-Reaktionen unter Beteiligung von Asp¹⁰². Im ersten Schritt kommt es zu einem nukleophilen Angriff von Asp¹⁰² auf das C1'-Atom der Ribose von Guanin(34)tRNA und der Ausbildung einer kovalenten

TGT/tRNA-Zwischenstufe. Nach Verdrängung des substituierten Guanins in der Bindetasche durch preQ₁ wird in einer nachfolgenden S_N2-Reaktion das Produkt preQ₁(34)tRNA gebildet. In einem Gelshift-Experiment konnte der intermediäre TGT/tRNA-Komplex sowohl für den TGT-Wildtyp als auch für TGT(S103A) nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis und die minimale Restaktivität von TGT(S103A) beweisen, daß Asp¹⁰² als aktives Nukleophil in der Basenaustausch-Reaktion involviert ist. Dagegen konnten die Studien in dieser Arbeit zeigen, daß Ser¹⁰³ eine kritische Funktion bei der Immobilisierung und Orientierung von Guanin-34 in der Enzymreaktion erfüllt.

Die biochemischen und kristallographischen Studien gaben damit weitere Aufschlüsse über den Enzymmechanismus und die Substratspezifität der TGT. Mit diesen Informationen wurde eine erste Suche nach neuen Leitstrukturen mit dem Computer-Programm LUDI durchgeführt. Das Ziel bestand darin, Vorschläge aus einer Substanz-Datenbank zu erhalten, die aufgrund ihrer Struktur ein günstiges Wechselwirkungsmuster in der Bindetasche der *Z. mobilis* TGT erwarten ließen. Ausgehend von der Kristallstruktur der TGT in Komplex mit preQ₁ wurde mit LUDI zunächst ein pharmakophorähnliches Modell abgeleitet, das als Templat für die Datenbanksuche diente. Dazu wurden regelbasierte Wechselwirkungszentren („sites“) von LUDI im Bereich der Aminosäuren plziert, die im aktiven Zentrum an der spezifischen Substratbindung beteiligt sind. Die experimentell gefundenen Bindungsmuster von preQ₁ und weiteren Substrat-Analoga wurden bei der Plzierung der Wechselwirkungszentren berücksichtigt. Mit diesen Vorgaben wurden LUDI-sites für H-Donoren (Asp¹⁵⁶, Asp¹⁰²) und H-Akzeptoren (Gln²⁰³, Gly²³⁰ und Leu²³¹) sowie für lipophile Kontakte (Tyr¹⁰⁶, Cys¹⁵⁸ und Met²⁶⁰) generiert. Anschließend wurden mit LUDI kleine Moleküle aus einer Datenbank auf diesen Wechselwirkungszentren plziert und mit einer einfachen Scoring-Funktion bewertet. Dabei erhielten solche Moleküle eine hohe Bewertung, deren Struktur eine möglichst gute Komplementarität zu dem vorgegebenen Pharmakophor-Modell erlaubte. Die Suche erfolgte in dem *Available Chemical Directory* (ACD), einer Datenbank mit über 180.000 Verbindungen, die kommerziell erhältlich sind oder deren Synthese in der Literatur beschrieben ist. In diesem ersten *de novo*-Design-Zyklus konnten zahlreiche Vorschläge erhalten werden, von denen acht Verbindungen aufgrund ihres hohen Scoring-Wertes und ihrer kommerziellen Verfügbarkeit zur experimentellen Testung ausgewählt wurden. Jede der ausgewählten Verbindungen wurde im Enzymassay und kristallographisch in Komplex mit der TGT untersucht. Dabei zeigten zwei Verbindungen (2,3-Dihydroxybenzoesäure und 1,8-Naphthalinsultam) eine Bindungsaffinität im millimolaren Bereich. Eine weitaus

deutlichere Inhibition ($K_i = 8,3 \mu\text{M}$) der *Z. mobilis* TGT konnte dagegen mit dem vorgeschlagenen 4-Aminophthalsäurehydrazid beobachtet werden.

Im Enzymassay der TGT wird die zeitliche Einbaurate von radioaktiv markiertem $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$ in tRNA^{Tyr} verfolgt und somit eine kompetitive Inhibitionskonstante in Bezug auf Guanin erhalten. Diese Methode wurde in einer früheren Studie zur Charakterisierung von preQ_1 -Analoga als Inhibitoren der *E. coli* TGT angewendet. In der vorliegenden Studie sollten Affinitätskonstanten gegenüber der *Z. mobilis* TGT gemessen werden, da mit diesem Enzym auch die kristallographische Charakterisierung der Inhibitoren erfolgte. Überraschenderweise mußte dabei das 4-Aminophthalsäurehydrazid zunächst in Abwesenheit der Substrate ($[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$ und tRNA^{Tyr}) mit der *Z. mobilis* TGT inkubiert werden, um eine deutliche Inhibierung der Enzymreaktion zu erreichen. Daher mußten die Bedingungen für den Inhibitionsassay der *Z. mobilis* TGT im Rahmen dieser Arbeit modifiziert werden. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde eine Tyrosin-106-Tryptophan-Mutante (Y106W) konstruiert, die möglicherweise in Zukunft für einen alternativen Enzymassay auf Basis von Fluoreszenz-Messungen genutzt werden kann. In dieser Mutante übernimmt das Trp^{106} im aktiven Zentrum der TGT die Funktion eines intrinsischen „Sensors“, über dessen Änderung der Fluoreszenzeigenschaften Rückschlüsse über die Populierung der Bindetasche mit einem Inhibitor erhalten werden könnten. Die Enzymaktivität von TGT(Y106W) wurde durch die Mutation nur geringfügig beeinflusst. In der Kristallstruktur ist zudem der Bindungsmodus von preQ_1 wohldefiniert.

Der Bindungsmodus von 4-Aminophthalsäurehydrazid konnte durch „Soaking“ der Verbindung in Kristalle der *Z. mobilis* TGT bestimmt werden. Dabei stimmte der experimentell bestimmte Bindungsmodus ($1,95 \text{ \AA}$ Auflösung) sehr gut mit der von LUDI vorgeschlagenen Bindungsposition (RMS-Wert = $0,27 \text{ \AA}$) überein. Das Wechselwirkungsmuster des Inhibitors in der Bindetasche gleicht dem von preQ_1 , jedoch unterscheidet sich die Struktur wesentlich von den bisher beschriebenen TGT-Inhibitoren. Vergleichbare Anwendungen von LUDI, die wie in dieser Arbeit zu einer erfolgreichen Identifizierung einer Leitstruktur aus einer Datenbanksuche führten, sind in der Literatur nur vereinzelt zu finden.

Die wohldefinierte Kristallstruktur sowie die gemessene Inhibitionskonstante im unteren mikromolaren Bereich waren optimale Voraussetzungen, 4-Aminophthalsäurehydrazid als Leitstruktur für weitere Design-Zyklen zu verwenden. Durch Analyse der Bindetasche konnten drei polare Aminosäure-Reste (Asp^{102} , Asn^{70} und Asp^{280}) gefunden werden, die benachbart zu dem Molekülgerüst von 4-Aminophthalsäurehydrazid angeordnet sind. In

dieser Region ist vermutlich der Riboserest des Guanosin-34 der gebundenen tRNA zu suchen.

Im zweiten Design-Zyklus sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob die Hydrazid-Funktion der Leitstruktur durch eine Imid-Gruppe ersetzt werden kann. In der Literatur konnte dazu eine Synthesemethode gefunden werden, die in Zusammenarbeit mit Hans-Dieter Gerber (AG Prof. Klebe) weiter ausgearbeitet wurde. Zunächst wurde die Vorstufe 3,5-Dinitrophthalsäureimid in drei Syntheseschritten aus 3,5-Dinitro-2-methylbenzoesäure erhalten. Diese Vorstufe wurde zu 3,5-Diaminophthalsäureimid reduziert und daraus das Hydrazid erhalten. Dabei zeigte 3,5-Diaminophthalsäurehydrazid im Vergleich zu 4-Aminophthalsäurehydrazid eine um den Faktor 40 höhere Bindungsaffinität ($K_i = 0,2 \mu\text{M}$). In der Kristallstruktur (1,85 Å Auflösung) sind beide Verbindungen in einer identischen Position gebunden, jedoch liegen im Fall des 3,5-Diamino-Derivates zusätzliche H-Brücken zwischen der 3-NH₂-Gruppe und zwei Wassermolekülen vor. Dadurch werden verbrückende Kontakte zu Asp¹⁰² erreicht, die einen zusätzlichen Beitrag zur erhöhten Affinität liefern. Die Bindungskonstanten von 4-Amino- bzw. 3,5-Diaminophthalsäureimid zeigten in Bezug auf die Leitstruktur ebenfalls eine leichte Verbesserung der Affinität ($K_i = 4,8 \mu\text{M}$ bzw. $2,1 \mu\text{M}$). Allerdings konnten in beiden Fällen mit der Röntgenstrukturanalyse keine definierten Positionen der Inhibitoren in der Bindetasche bestimmt werden. Die Wechselwirkung der Hydrazin-Gruppe über zwei H-Donoren mit der Carboxylatgruppe von Asp¹⁵⁶ liefert somit einen entscheidenden Beitrag zur Fixierung des Phthalsäurehydrazid-Gerüsts in der Bindetasche. Als weitere Alternativen mit einem Leitstruktur-analogen Molekülgerüst wurden jeweils zwei Derivate des Naphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazids und des Naphthalin-1,8-dicarbonsäurehydrazids experimentell untersucht. Darunter zeigte 5-Aminonaphthalin-2,3-dicarbonsäurehydrazid eine Bindungsaffinität im unteren mikromolaren Bereich ($K_i = 0,3 \mu\text{M}$). In der Kristallstruktur (1,85 Å Auflösung) ist diese Verbindung in vergleichbaren Position wie die Leitstruktur gebunden. Die Synthese dieser Verbindung wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Damit steht eine alternative Grundstruktur für das Design neuer Inhibitoren zur Verfügung.

Die Ergebnisse des zweiten Design-Zyklus haben gezeigt, daß eine Derivatisierung der Leitstruktur in 6-Position vielversprechend ist. Ein Einbeziehen der polaren Aminosäuren Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰ in die Inhibitorbindung schien sich vorteilhaft auf die Bindungsaffinität auszuwirken. Daher wurde nach 5- oder 6-Ring-Substituenten zur Erweiterung von 4-Aminophthalsäurehydrazid gesucht, die über H-Donoren mit den polaren Aminosäuren wechselwirken können. In der Literatur wurde eine Synthesemethode gefunden, mit der eine

Derivatisierung nach den getroffenen Vorgaben erreicht werden konnte. Die Synthese erfolgte dabei durch die regioselektive Einführung von Thiolen in die 3-Position von 3,5-Dinitrophthalsäureimid. Die weitere Synthesestrategie umfaßte eine Reduktion der 5-Nitro-Gruppe zum Amin und eine Modifikation der Phthalsäureimid-Funktion in das entsprechende Phthalsäurehydrazid. Mit dieser Synthesefolge konnten daher Leitstruktur-Derivate erhalten werden, die mit einem Thiol-Rest in 6-Position (entsprechend in der 3-Position von 3,5-Dinitrophthalsäureimid) erweitert sind. Zunächst sollten kommerziell verfügbare oder synthetisch leicht zugängliche 5- bzw. 6-Ring-Thiole in einer Datenbanksuche identifiziert werden. Zur Selektion geeigneter Fragmente mit mindestens einer H-Donor-Gruppe wurde das Computer-Programm UNITY verwendet. Dieses Programm ermöglicht die Definition eines atombasierten Pharmakophors als geometrisches Kriterium zur Datenbanksuche. Ausgehend von der Kristallstruktur der TGT in Komplex mit der Leitstruktur wurden H-Donoren im Bereich der polaren Aminosäuren (Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰) platziert. Durch Anwendung eines schrittweisen Filteralgorithmus und einer abschließenden flexiblen 3D-Suche in der ACD konnten vierzehn kommerziell erhältliche Thiole mit passenden H-Donor-Eigenschaften aus über 180.000 Datenbank-Einträgen erhalten werden. Die entsprechenden Thiol-Derivate der Leitstruktur wurden zunächst als Strukturmodelle am Bildschirm aufgebaut und mit dem Computer-Programm FlexX in die Bindetasche der TGT eingedockt. Die Plazierungen wurden mit der Scoring-Funktion DrugScore bewertet und mit experimentellen Bindungskonstanten aus dieser Arbeit korreliert. Auf Grundlage dieser Docking-Studien wurden jeweils zwei 5- und 6-Ring-Thiole zur Synthese ausgewählt.

In Zusammenarbeit mit Hans-Dieter Gerber (AG Prof. Klebe) konnte die Synthesevorschrift mit den Thiol-Derivaten 3-Mercapto-[1,2,4]-triazol und 3-Amino-5-mercapto-[1,2,4]-triazol erfolgreich umgesetzt werden. Die entsprechenden Leitstruktur-Derivate wurden im Enzymassay und kristallographisch charakterisiert. Überraschenderweise waren die Bindungsaffinitäten beider 1,2,4-Triazol-Derivate im Vergleich zur Leitstruktur ($K_i = 8,3 \mu\text{M}$) deutlich reduziert. Dabei zeigte das 5-Amino-(1H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-phthalsäurehydrazid einen K_i -Wert von $54 \mu\text{M}$. Der eingeführte 1,2,4-Triazol-Rest besetzt, wie beabsichtigt, die polare Tasche in Nachbarschaft zum 5-Aminophthalsäurehydrazid-Fragment und wechselwirkt über eine zusätzliche H-Brücke zu Asp²⁸⁰. Für das um eine NH₂-Gruppe erweiterte Derivat 5-Amino-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-phthalsäurehydrazid konnte ein K_i -Wert von $38 \mu\text{M}$ gemessen werden. Die Struktur dieses Inhibitors in Komplex mit der TGT wurde mit einer hohen Auflösung ($1,4 \text{ \AA}$) am „Deutschen Elektronen

Synchrotron“ (DESY Hamburg) bestimmt. Interessanterweise konnte der 5-Amino-1,2,4-triazol-Ring nicht eindeutig in der polaren Tasche anhand der experimentellen $|F_o - F_c|$ -Differenzelektronendichte lokalisiert werden. Zur weiteren Klärung der reduzierten Bindungsaffinität und der beobachteten Unordnung in der Struktur des Protein-Inhibitor-Komplexes wurde die Kristallstruktur von 5-Amino-(5-amino-1H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-phthalsäurehydrazid bestimmt. Die Kristallisation der Verbindung gelang in der wäßrigen Puffer-Lösung (pH 8,5), die auch zum „Soaking“ von Kristallen der *Z. mobilis* TGT verwendet wurde. In der Kristallstruktur des Inhibitors, die unter kryogenen Bedingungen bestimmt wurde, ist ein Proton am N1'-Stickstoffatom des 5-Amino-1,2,4-triazol-Rings lokalisiert. Zur Aufklärung des Protonierungszustands der Verbindung wurden in dieser Arbeit potentiometrische Titrations durchgeführt. Diese pK_a -Messungen ergaben, daß die Verbindung bei pH 8,5 neutral ist und in dieser Form vermutlich auch in der TGT-Bindetasche vorliegt. Auf Grundlage der pK_a -Messungen und der Kristallstrukturen wurden zwei alternative Bindungsmodi des 5-Amino-1,2,4-triazol-Rings in der polaren Tasche modelliert. In einer modellierten Bindungsposition ist die 5-Amino-Gruppe zu Asp²⁸⁰ orientiert und das N2'-Stickstoffatom des Triazols liegt in H-Brücken-Distanz zu Asp¹⁰². Neben diesen attraktiven Wechselwirkungen liegen jedoch auch repulsive Kontakte zwischen dem N1'-Stickstoffatom und Asn⁷⁰ vor. In der anderen modellierten Orientierung befinden sich die 5'-NH₂-Gruppe und Asn⁷⁰ bzw. das N1'-Stickstoffatom und Asp²⁸⁰ auf H-Brücken-Distanz. Auch in diesem Bindungsmodus liegen repulsive Kontakte zwischen dem N4'-Stickstoffatom und Asn¹⁰² vor. Die beiden modellierten Orientierungen legen daher nahe, daß der 5-Amino-1,2,4-Triazol-Ring aufgrund seines Protonierungszustands offensichtlich kein günstiges H-Brückenmuster in der polaren Tasche ausbilden kann. Dieses Modell steht im Einklang mit der beobachteten Unordnung des 5-Amino-1,2,4-Triazol-Rings in der Kristallstruktur und der reduzierten Bindungsaffinität. Die Kristallstrukturen der bisherigen Leitstruktur-Derivate in Komplex mit der TGT wurden überlagert und die Bindungsgeometrien der gebundenen Liganden analysiert. Im Fall der Thiol-Derivate ist das 5-Aminophthalsäurehydrazid-Fragment deutlich aus seiner optimalen Bindungsposition herausgedreht und dadurch die H-Brücke zwischen der 5-NH₂-Gruppe und Leu²³¹ geschwächt. Daraus ergibt sich eine weitere Erklärung für den beobachteten Abfall der Bindungsaffinitäten durch Einführung eines Triazol-Restes in die Leitstruktur.

Mit den Erkenntnis des dritten Design-Zyklus wurden Thiol-Derivate neuerer Generation vorgeschlagen, die ein insgesamt günstigeres Wechselwirkungsmuster erwarten lassen. Berücksichtigt wurden dabei Fragmente, in denen zum einen das 5-Aminophthalsäure-

hydrazid-Gerüst möglichst in der optimalen Bindungsposition angeordnet ist. Andererseits sollten die H-Donoren des eingeführten Rings ein günstiges H-Brückenmuster in der polaren Tasche erlauben. Modellierungsstudien haben gezeigt, daß diese Vorgaben durch eine zusätzliche Methylengruppe erreicht werden kann, über die der eingeführte Ring mit dem Thiol-Schwefelatom des Leitstruktur-Fragmentes verknüpft ist. In einer Datenbanksuche konnten einige vielversprechende Pyrrolidin- bzw. Piperidin-Derivate erhalten werden, die das geforderte Strukturmuster befriedigen. Die daraus abgeleiteten Strukturmodelle wurden mit FlexX in der TGT-Bindetasche plziert und die Bindungsaffinitäten mit DrugScore vorhergesagt. Die vorgeschlagenen Docking-Lösungen zeigten sowohl eine optimale Bindungsposition für das 5-Aminophthalsäurehydrazid-Fragment als auch günstige Wechselwirkungen der H-Donoren zu Asp¹⁰², Asn⁷⁰ und Asp²⁸⁰.

In dieser Arbeit wurde in einer Datenbanksuche unter Anwendung des *de novo*-Design-Programms LUDI das 4-Aminophthalsäurehydrazid als Inhibitor der TGT identifiziert. Die Struktur unterscheidet sich wesentlich von den bisher beschriebenen Substrat-Analoga und liefert die Basis für das weitere strukturbasierte Design. Bereits durch Einführung einer weiteren Aminogruppe in die Leitstruktur konnte eine deutliche Verbesserung der Bindungsaffinität um den Faktor 40 ($K_i = 0,2 \mu\text{M}$) erreicht werden. Die aufgezeigten Design-Strategien ermöglichen eine weitere Derivatisierung der Leitstruktur und damit eine Optimierung der Bindungseigenschaften. Ein *in vivo*-Test wird in Zukunft eine Aussage über die biologische Wirksamkeit der in dieser Arbeit entwickelten Inhibitoren gegenüber den Shigellen liefern. Daraus könnte sich auch das therapeutische Potential der TGT im Hinblick auf die erfolgreiche Unterdrückung der Bakterienruhr ableiten.

8 Literaturverzeichnis

- Adam, T., Giry, M., Boquet, P. & Sansonetti, P. J. (1996). Rho-dependent membrane folding causes *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J.* **15**:, 3315-3321.
- Ajay & Murcko, M. A. (1995). Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes. *J Med Chem* **38**(26), 4953-67.
- Ansaldi, M., Lepelletier, M. & Mejean, V. (1996). Site-specific mutagenesis by using an accurate recombinant polymerase chain reaction method. *Anal Biochem* **234**(1), 110-1.
- Avdeef, A., Brown, D. L. & Chemotti, A. R. J. (1982). Bjerrum Plots for the Determination of Systematic Concentration Errors in Titration Data. *Anal. Chem.* **54**, 2322-2326.
- Aveef, A. & Bucher, J. j. (1978). Accurate Measurements of the Concentration of Hydrogen Ions with a Glass electrode: Calibrations Using the Prideaux and Other Universal Buffer Solutions and a Computer-Controlled Automatic Titrator. *Anal. Chem.* **50**, 2137-2142.
- Babine, R. E., Bleckman, T. M., Kissinger, C. R., Pelletier, L. A., Lewis, C., Tucker, K., Moomaw, E., Parge, H. E. & Villafranca, J. E. (1995). Design, Synthesis and X-ray Crystallographic Studies of Novel FKBP-12 Ligands. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 1719-1724.
- Babu, Y. S., Montgomery, J. A., Bugg, C. E., Carson, W. M., Narayana, S. V. L., Cook, W. J., Ealick, S. E., Guida, W. C., Erion, M. D. & Secrist, J. A. (1997). Design of Purine Nucleoside Phosphorylase Inhibitors. In *Structure-Based Drug Design*. (Veerapandian, P., ed.), Vol. 1, pp. 151-169. 3 Vols. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Baker, W. (1934). Derivatives of Naphthalene-2,3-dicarboxylic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **307**, 1413-1414.
- Bashford, D. & Karplus, M. (1990). pKa's of ionizable groups in proteins: atomic detail from a continuum electrostatic model. *Biochemistry* **29**(44), 10219-25.
- Bennish, M. L., Salam, M. A., Khan, W. A. & Khan, A. M. (1992). Treatment of shigellosis: III. Comparison of one- or two-dose ciprofloxacin with standard 5-day therapy. A randomized, blinded trial. *Ann Intern Med* **117**(9), 727-34.
- Bernardini, M. L., Mounier, H., d'Hauteville, H., Coquis-Rondon, M. & Sansonetti, P. J. (1989). Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:, 3867-3871.

- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. E., Jr., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol* **112**(3), 535-42.
- Bhown, A. S., Wayland, J. L., Jr., Lynn, J. D. & Bennett, J. C. (1988). Conversion of the beckman liquid phase sequencer to a gas-liquid phase sequencer. *Anal Biochem* **175**(1), 39-51.
- Bienz, M. & Kubli, E. (1981). Wild-type tRNA_G^{Tyr} reads the TMV RNA stop codon, but Q-modified tRNA_G^{Tyr} does not. *Nature* **294**, 188-190.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**(1513-1523).
- Björk, G. R. (1996). Stable RNA modification. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. 2nd. edit. (Neidhardt, F. C. e. a., ed.). American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bohacek, R. S. & McMartin, C. (1994). Multiple highly diverse structures complementary to enzyme binding-sites. Results of extensive application of a *de novo*-design method incorporating combinatorial growth. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5560-5571.
- Böhm, H. J. (1992a). The computer program LUDI: a new method for the *de novo*-design of enzyme inhibitors. *J Comput Aided Mol Des* **6**(1), 61-78.
- Böhm, H. J. (1992b). LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *J Comput Aided Mol Des* **6**(6), 593-606.
- Böhm, H. J. (1994a). The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J Comput Aided Mol Des* **8**(3), 243-56.
- Böhm, H. J. (1994b). On the use of LUDI to search the Fine Chemicals Directory for ligands of proteins of known three-dimensional structure. *J Comput Aided Mol Des* **8**(5), 623-32.
- Böhm, H. J. (1996). Current computational tools for *de novo* ligand design. *Curr Opin Biotechnol* **7**(4), 433-6.
- Böhm, H.-J. & Klebe, G. (1996). What can we learn from molecular recognition in protein-ligand complexes for the design of new drugs? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**(22), 2566-2587.

- Brünger, A. T. (1992). The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-474.
- Brünger, A. T. (1998). X-PLOR, Version 3.4: A system for X-ray crystallography and NMR., Yale University Press, New Haven, CT.
- Burley, S. K., Almo, S. C., Bonanno, J. B., Capel, M., Chance, M. R., Gaasterland, T., Lin, D., Sali, A., Studier, F. W. & Swaminathan, S. (1999). Structural genomics: beyond the human genome project. *Nat Genet* **23**(2), 151-7.
- Butler, T. (1996). Shigellosis. In *Cecil Textbook of Medicine* (Bennet, J. & Plum, F., eds.), pp. 1647-1648.
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980). *Biophysical Chemistry*. Part 11: Techniques for the Study of Biological Structure and Function, W.H. Freeman, San Francisco.
- Carlson, B. A., Kwon, S. Y., Chamorro, M., Oroszlan, S., Hatfield, D. L. & Lee, B. J. (1999). Transfer RNA modification status influences retroviral ribosomal frameshifting. *Virology* **255**(1), 2-8.
- Chamberlain, Evans & Bromilow. (1996). *Pestic. Sci.* **47**(3), 265-272.
- Chopra, M., Wilkinson, D. & Stirling, S. (1997). Epidemic shigella dysentery in children in northern KwaZulu-Natal [see comments]. *S Afr Med J* **87**(1), 48-51.
- Clark, D. E. & Westhead, D. R. (1996). Evolutionary algorithms in computer-aided molecular design. *J Comput Aided Mol Des* **10**(4), 337-58.
- Cleland, W. W. (1963). *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 104-137.
- Curnow, A. W. & Garcia, G. A. (1994). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: recognition of dimeric, unmodified tRNA(Tyr). *Biochimie* **76**(12), 1183-91.
- Curnow, A. W. & Garcia, G. A. (1995). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*. Minimal tRNA structure and sequence requirements for recognition. *J Biol Chem* **270**(29), 17264-7.
- Curnow, A. W., Kung, F. L., Koch, K. A. & Garcia, G. A. (1993). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: gross tRNA structural requirements for recognition. *Biochemistry* **32**(19), 5239-46.
- Dehio, C. (1998). Virulenzmechanismus des Ruhrerregers *Shigella flexneri*: Ein Paradigma der Pathogenitätsforschung. *Biospektrum* **4. Jahrgang**(3), 25-29.
- Dehio, C., Prevost, M. C. & Sansonetti, P. J. (1995). Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway. *EMBO J.* **14**., 2471-2482.

- DeWitte, R. & Shakhnovich, E. (1996). SMOG: de novo design method based on simple, fast, and accurate free energy estimates. I. Methodology and supporting evidence. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11733-11744.
- Dill, K. A. (1997). Additivity principles in biochemistry. *J Biol Chem* **272**(2), 701-4.
- Dirheimer, G., Baranowski, W. & Keith, G. (1995). Variations in tRNA modifications, particularly of their queuine content in higher eukaryotes. Its relation to malignancy grading. *Biochimie* **77**(1-2), 99-103.
- Dixon, J. S. (1997). Evaluation of the CASP2 docking section. *Proteins Suppl*(1), 198-204.
- Dixon, M. & Webb, E. C. (1979). *Enzymes*, 3rd Edition, Academic Press, New York.
- Drew, H. D. K. & Garwood, R. F. (1939). Chemiluminescent Compounds. Part VII. Substituted Phthalaz-1,4-diones. Effect of Substituents on the Luminescent Power. *J. Am. Chem. Soc.* **177**, 836-837.
- Durand, J. M., Bjork, G. R., Kuwae, A., Yoshikawa, M. & Sasakawa, C. (1997). The modified nucleoside 2-methylthio-N6-isopentenyladenosine in tRNA of *Shigella flexneri* is required for expression of virulence genes. *J Bacteriol* **179**(18), 5777-82.
- Durand, J. M., Dagberg, B., Uhlin, B. E. & Bjork, G. R. (2000). Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the *virF* gene. *Mol Microbiol* **35**(4), 924-35.
- Durand, J. M., Okada, N., Tobe, T., Watarai, M., Fukuda, I., Suzuki, T., Nakata, N., Komatsu, K., Yoshikawa, M. & Sasakawa, C. (1994). *vacC*, a virulence-associated chromosomal locus of *Shigella flexneri*, is homologous to *tgt*, a gene encoding tRNA-guanine transglycosylase (Tgt) of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **176**(15), 4627-34.
- Eftink, M. R. (1991). Fluorescence techniques for studying protein structure. *Methods Biochem Anal* **35**, 127-205.
- Eftink, M. R. (1997). Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions. *Methods Enzymol* **278**, 221-57.
- Eisen, M. B., Wiley, D. C., Karplus, M. & Hubbard, R. E. (1994). HOOK: a program for finding novel molecular architectures that satisfy the chemical and steric requirements of a macromolecule binding site. *Proteins* **19**(3), 199-221.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr.* **47**, 392-400.

- Erion, M. D., Niwas, S., Rose, J. D., Ananthan, S., Allen, M., Secrist, J. A. d., Babu, Y. S., Bugg, C. E., Guida, W. C., Ealick, S. E. & et al. (1993). Structure-based design of inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. 3. 9-Arylmethyl derivatives of 9-deazaguanine substituted on the methylene group [published erratum appears in J Med Chem 1994 Apr 1;37(7):1034]. *J Med Chem* **36**(24), 3771-83.
- Farkas, W. R., Jacobson, K. B. & Katze, J. R. (1984). Substrate and inhibitor specificity of tRNA-guanine ribosyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **781**(1-2), 64-75.
- Fischer, W. & Kvita, V. (1985). Aromatic Nucleophilic Substitution. Part 1. Regiospecific Substitution of the Nitro Groups in 3,5-Dinitrophthalic-Acid Derivatives. *Helv. Chemica Acta* **68**.
- Fischer, W. & Kvita, V. (1991). Aromatic Nucleophilic Substitution. Part 3. Preparation of Novel 9-Oxo-9H-thioxanthene- and 9-Oxo-9H-xanthenedicarboximides and -dicarboxylates. *Helv. Chemica Acta* **74**, 1119-1126.
- Frey, B., Janel, G., Michelsen, U. & Kersten, H. (1989). Mutations in the *Escherichia coli* *fnr* and *tgt* genes: control of molybdate reductase activity and the cytochrome d complex by *fnr*. *J Bacteriol* **171**(3), 1524-30.
- Frey, B., McCloskey, J., Kersten, W. & Kersten, H. (1988). New function of vitamin B12: cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **170**(5), 2078-82.
- Gabryszewski, M. (1992). *Pol. J. Chem.* **66**(7), 1067-1075.
- Garcia, G. A. & Goodenough-Lashua, D. M. (1998). Mechanisms of RNA-Modifying and -Editing Enzymes. In *Modification and Editing of RNA*. (Grosjean, H. & Benne, R., eds.), pp. 135-168. ASM Press, Washington D.C.
- Garcia, G. A., Koch, K. A. & Chong, S. (1993). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*. Overexpression, purification and quaternary structure. *J Mol Biol* **231**(2), 489-97.
- Gasteiger, J. & Marsili, M. (1980). Iterative Partial Equilization of Orbital Electronegativity - A Rapid Access to Atomic Charges. *Tetrahedron* **36**, 3219-3228.
- Gohlke, H., Hendlich, M. & Klebe, G. (2000). Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J Mol Biol* **295**(2), 337-56.
- Goodford, P. (1985). A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* **28**(849-857).
- Goodsell, D. S., Morris, G. M. & Olson, A. J. (1996). Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit* **9**(1), 1-5.

- Grädler, U., Ficner, R., Garcia, G. A., Stubbs, M. T., Klebe, G. & Reuter, K. (1999). Mutagenesis and crystallographic studies of *Zymomonas mobilis* tRNA-guanine transglycosylase to elucidate the role of serine 103 for enzymatic activity. *FEBS Lett* **454**(1-2), 142-6.
- Greer, J., Erickson, J. W., Baldwin, J. J. & Varney, M. D. (1994). Application of the three-dimensional structures of protein target molecules in structure-based drug design. *J Med Chem* **37**(8), 1035-54.
- Grodberg, J. & Dunn, J. J. (1988). *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* **170**(3), 1245-53.
- Grosjean, H., Edqvist, J., Straby, K. B. & Giege, R. (1996). Enzymatic formation of modified nucleosides in tRNA: dependence on tRNA architecture. *J Mol Biol* **255**(1), 67-85.
- Gubernator, K. & Böhm, H.-J. (1998). *Structur-based ligand design.*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Gundermann & Drawert. (1962). Konstitution und Chemilumineszenz (I.). *J. prakt. Chem.* **95**.
- Gunduz, U., Elliott, M. S., Seubert, P. H., Houghton, J. A., Houghton, P. J., Trewyn, R. W. & Katze, J. R. (1992). Absence of tRNA-guanine transglycosylase in a human colon adenocarcinoma cell line. *Biochim Biophys Acta* **1139**(3), 229-38.
- Harada, F. & Nishimura, S. (1972). Possible anticodon sequences of tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, and tRNA^{Asp} from *Escherichia coli* B. Universal presence of nucleoside Q in the first position of the anticodons of these tRNAs. *Biochemistry* **11**., 301-308.
- High, N., Mounier, J., Prevost, M. C. & Sansonetti, P. J. (1992). IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J.* **11**., 1991-1999.
- Hodgson & Ward. (1945). *J. Chem. Soc.*, 590.
- Hoops, G. C., Townsend, L. B. & Garcia, G. A. (1995a). Mechanism-based inactivation of tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli* by 2-amino-5-(fluoromethyl)-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4 (3H)-one. *Biochemistry* **34**(47), 15539-44.
- Hoops, G. C., Townsend, L. B. & Garcia, G. A. (1995b). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: structure-activity studies investigating the role of the aminomethyl substituent of the heterocyclic substrate preQ₁. *Biochemistry* **34**(46), 15381-7.
- Houston, J. G. & Banks, M. (1997). The chemical-biological interface: developments in automated and miniaturised screening technology. *Curr Opin Biotechnol* **8**(6), 734-40.

- Hueck, C. L. (1998). Typ III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**., 379-433.
- Jacobson, K. B., Farkas, W. R. & Katze, J. R. (1981). Presence of queuine in *Drosophila melanogaster*: correlation of free pool with queuosine content of tRNA and effect of mutations in pteridine metabolism. *Nucleic Acids Res* **9**(10), 2351-66.
- Jones, G., Willet, P., Glen, R. C. & Leach, A. R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **267**., 727-748.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard. (1991). Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* **47**(Pt 2), 110-9.
- Joseph-McCarthy, D. (1999). Computational approaches to structure-based ligand design. *Pharmacology & Therapeutics* **84**, 179-191.
- Kasai, H., Nakanishi, K., Macfarlane, R. D., Torgerson, D. F., Ohashi, Z., McCloskey, J. Z., Gross, H. J. & Nishimura, S. (1976). Letter: The structure of Q nucleoside isolated from rabbit liver transfer ribonucleic acid. *J Am Chem Soc* **98**(16), 5044-6.
- Kersten, H., Schachner, E., Dess, G., Anders, A., Nishimura, S. & Shindo-Okada, N. (1983). . In *Biochemical and Clinical Aspects of Pterins*. (Curtius, H.-C., Pfeleiderer, W. & Wachter, H., eds.), pp. 367. Walter de Gruyter., Berlin.
- Khan, W. A., Seas, C., Dhar, U., Salam, M. A. & Bennish, M. L. (1997). Treatment of shigellosis: V. Comparison of azithromycin and ciprofloxacin. A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* **126**(9), 697-703.
- Kirtland, G. M., Morris, T. D., Moore, P. H., O'Brian, J. J., Edmonds, C. G., McCloskey, J. A. & Katze, J. R. (1988). Novel salvage of queuine from queuosine and absence of queuine synthesis in *Chlorella pyrenoidosa* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Bacteriol* **170**(12), 5633-41.
- Kjeldgaard, M., Nyborg, J. & Clark, B. F. (1996). The GTP binding motif: variations on a theme. *FASEB J* **10**(12), 1347-68.
- Klebe, G. (1994). The use of composite crystal-field environments in molecular recognition and the de novo design of protein ligands. *J Mol Biol* **237**(2), 212-35.
- Klebe, G. & Mietzner, T. (1994). A fast and efficient method to generate biologically relevant conformations. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **8**, 583-606.
- Kleywegt, G. J. (1997). Validation of protein models from C α coordinates alone. *J Mol Biol* **273**(2), 371-6.

- Kollman, P. A. (1993). Free energy calculations: applications to chemical and biochemical phenomena. *Chem. Rev.* **93**, 2395-2417.
- Kuchino, Y., Kasai, H., Nihei, K. & Nishimura, S. (1976). Biosynthesis of the modified nucleoside Q in transfer RNA. *Nucleic Acids Res* **3**(2), 393-8.
- Kuntz, I. D., Blaney, J. m., Oarley, S. J., Langridge, R. & Ferrin, T. E. (1982). A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **161**, 269-288.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamzin, V. S. & Wilson, K. S. (1993). ARP. *Acta Cryst.* **D49**, 129-147.
- Langgut, W., Reisser, T., Nishimura, S. & Kersten, H. (1993). Modulation of mammalian cell proliferation by a modified tRNA base of bacterial origin. *FEBS Lett* **336**(1), 137-42.
- Lauri, G. & Bartlett, P. A. (1994). CAVEAT: a program to facilitate the design of organic molecules. *J Comput Aided Mol Des* **8**(1), 51-66.
- Leach, A. R. (1996). *Molecular Modelling: principles and applications.*, Addison Wesley Longman Ltd., Essex.
- Lett, M.-C., Sasakawa, C., Okada, N., Sakai, T., Makino, S., Yamada, M., Komatsu, K. & Yoshikawa, M. (1989). *virG*, a plasmid-coded virulence gene of *Shigella flexneri*: identification of the VirG protein and determination of the complete coding sequence. *J. Bacteriol.* **171**., 353-359.
- Makino, S. & Kuntz, I. D. (1997). Automated flexible ligand docking method and its application for database search. *J. Comput. Chem.* **18**, 1812-1825.
- Marczinke, B., Hagervall, T. & Brierley, I. (2000). The Q-base of asparaginyl-tRNA is dispensable for efficient -1 ribosomal frameshifting in eukaryotes. *J Mol Biol* **295**(2), 179-91.
- Mates, A., Eyny, D. & Philo, S. (2000). Antimicrobial resistance trends in *Shigella* serogroups isolated in Israel, 1990-1995 [In Process Citation]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**(2), 108-11.
- McMartin, C. & Bohacek, R. S. (1997). QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. *J Comput Aided Mol Des* **11**(4), 333-44.
- MDL. (1997). Information Systems, Inc. ACD Available Chemicals Directory, San Leandro, CA, USA.
- Meier, F., Suter, B., Grosjean, H., Keith, G. & Kubli, E. (1985). Queuosine modification of the wobble base in tRNA^{His} influences 'in vivo' decoding properties. *Embo J* **4**(3), 823-7.

- Menard, R., Dehio, C. & Sansonetti, P. j. (1996a). Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol.* **4**., 220-226.
- Menard, R., Prevost, M. C., Gounon, P., Sansonetti, P. & Dehio, C. (1996b). The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**., 1254-1258.
- Miranker, A. & Karplus, M. (1991). Functionality maps of binding sites: a multiple copy simultaneous search method. *Proteins* **11**(1), 29-34.
- Miranker, A. & Karplus, M. (1995). An automated method for dynamic ligand design. *Proteins* **23**(4), 472-90.
- Moon, J. B. & Howe, W. J. (1991). Computer design of bioactive molecules: a method for receptor-based *de novo* ligand design. *Proteins* **11**(4), 314-28.
- Muralidhar, G., Utz, E. D., Elliott, M. S., Katze, J. R. & Trewyn, R. W. (1988). Identifying inhibitors of queuine modification of tRNA in cultured cells. *Anal Biochem* **171**(2), 346-51.
- Nakanishi, S., Ueda, T., Hori, H., Yamazaki, N., Okada, N. & Watanabe, K. (1994). A UGU sequence in the anticodon loop is a minimum requirement for recognition by *Escherichia coli* tRNA-guanine transglycosylase. *J Biol Chem* **269**(51), 32221-5.
- Nicklaus, M. C., Milne, G. W. & Zaharevitz, D. (1993). Chem-X and CAMBRIDGE. Comparison of computer generated chemical structures with X-ray crystallographic data. *J Chem Inf Comput Sci* **33**(4), 639-46.
- Noguchi, S., Nishimura, Y., Hirota, Y. & Nishimura, S. (1982). Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant lacking tRNA-guanine transglycosylase. Function and biosynthesis of queuosine in tRNA. *J Biol Chem* **257**(11), 6544-50.
- Noguchi, S., Yamaizumi, Z., Ohgi, T., Goto, T., Nishimura, Y., Hirota, Y. & Nishimura, S. (1978). Isolation of Q nucleoside precursor present in tRNA of an *E. coli* mutant and its characterization as 7-(cyano)-7-deazaguanosine. *Nucleic Acids Res* **5**(11), 4215-23.
- Okada, N. & Nishimura, S. (1979). Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **254**(8), 3061-6.
- Otwinowski, Z. (1993). DENZO, Yale University, New Have, CT.
- Parchment, O. G., Hillier, I. H., Green, D. V. S., Burton, N. A., Morley, J. O. & Schaefer III, H. F. (1992). A Theoretical Study, using *ab initio* Methods, of Tautomerism in 3-Amino-1,2,4-Triazole in the Gas Phase and in Aqueous Solution. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 1681-1684.

- Parks, R. E. & Agarwal, R. P. (1972). The Enzymes. (Boyer., ed.), Vol. 7, pp. 483-514. Academic Press., New York.
- Pearlman, D. A. & Murcko, M. A. (1996). CONCERTS: dynamic connection of fragments as an approach to de novo ligand design. *J Med Chem* **39**(8), 1651-63.
- Perrin, D. D. (1965). *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution*. (Chemistry., I. U. o. P. a. A., Ed.), Butterworths, London.
- Petsko, G. A. (1996). For medicinal purposes. *Nature* **384**(6604 Suppl), 7-9.
- Pisabarro, M. T., Ortiz, A. R., Palomer, A., Cabre, F., Garcia, L., Wade, R. C., Gago, F., Mauleon, D. & Carganico, G. (1994). Rational modification of human synovial fluid phospholipase A2 inhibitors. *J Med Chem* **37**(3), 337-41.
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T. & Klebe, g. (1996). A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.* **261**, 470-489.
- Reardon, D. & Farber, G. K. (1995). The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins [see comments]. *FASEB J* **9**(7), 497-503.
- Reuter, K., Chong, S., Ullrich, F., Kersten, H. & Garcia, G. A. (1994). Serine 90 is required for enzymic activity by tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**(23), 7041-6.
- Reuter, K. & Ficner, R. (1995). Sequence analysis and overexpression of the *Zymomonas mobilis* *tgt* gene encoding tRNA-guanine transglycosylase: purification and biochemical characterization of the enzyme. *J Bacteriol* **177**(18), 5284-8.
- Reuter, K., Slany, R., Ullrich, F. & Kersten, H. (1991). Structure and organization of *Escherichia coli* genes involved in biosynthesis of the deazaguanine derivative queuine, a nutrient factor for eukaryotes. *J Bacteriol* **173**(7), 2256-64.
- Rohde, J. E. (1984). Selective primary health care: Strategies for control disease in the developing world. XV. Acute Diarrhea. *Rev. Infect. Dis.* **6**, 840-854.
- Romier, C., Ficner, R., Reuter, K. & Suck, D. (1996a). Purification, crystallization, and preliminary x-ray diffraction studies of tRNA-guanine transglycosylase from *Zymomonas mobilis*. *Proteins* **24**(4), 516-9.
- Romier, C., Meyer, J. E. & Suck, D. (1997). Slight sequence variations of a common fold explain the substrate specificities of tRNA-guanine transglycosylases from the three kingdoms. *FEBS Lett* **416**(1), 93-8.
- Romier, C., Reuter, K., Suck, D. & Ficner, R. (1996b). Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange. *EMBO J* **15**(11), 2850-7.

- Romier, C., Reuter, K., Suck, D. & Ficner, R. (1996c). Mutagenesis and crystallographic studies of *Zymomonas mobilis* tRNA-guanine transglycosylase reveal aspartate102 as the active site nucleophile. *Biochemistry* **35**(49), 15734-9.
- Rotstein, S. H. & Murcko, M. A. (1993a). GenStar: a method for *de novo* drug design. *J Comput Aided Mol Des* **7**(1), 23-43.
- Rotstein, S. H. & Murcko, M. A. (1993b). GroupBuild: a fragment-based method for *de novo* drug design. *J Med Chem* **36**(12), 1700-10.
- Ruff, M., Krishnaswamy, S., Boeglin, M., Poterszman, A., Mitschler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J. C. & Moras, D. (1991). Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp). *Science* **252**(5013), 1682-9.
- Sadowski, J. (1997). A hybrid approach for addressing ring flexibility in 3D database searching. *J Comput Aided Mol Des* **11**(1), 53-60.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Ehrlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(487-491).
- Sakai, T., Sasakawa, C., Makino, S., Kamata, K. & Yoshikawa, M. (1986). Molecular cloning of a genetic determinant for Congo red binding ability which is essential for the virulence of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **51**(2), 476-82.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. Second Edition edit. Molecular cloning. A Laboratory Manual., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M. & Smith, M. (1977). Nuclotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**(5596), 687-95.
- Sansonetti, P. J., Kopecko, D. J. & Formal, S. B. (1982). Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri* 2a. *Infect. Immun.* **54**, 852-860.
- Sasakawa, C. (1995). Molecular basis of pathogenicity of *Shigella*. *Rev. Med. Microbiol.* **6**., 257-266.
- Schapira, C. B., Abasolo, M. I. & Perillo, I. A. (1985). 4-Hydroxy-1(2H)-isoquinolone-3-carboxamides. Synthesis and Properties. *J. Heterocyclic Chem.* **22**, 577-581.
- Schramm, V. L. (1997). Enzymatic N-riboside scission in RNA an RNA precursors. *Curr. Opin. in Chem. Biol.* **1**., 323-331.
- Schwenkkras, P. & Otto, H.-H. (1990). *Arch. Pharm. (Weinheim Ger.)* **323**(2), 93-98.

- Selector. (1996). Selector. Tripos Inc., St. Louis, MO.
- Sheldrick, G. (1990). SHELX. *Acta Cryst.* **A46**, 467-473.
- Shindo-Okada, N., Okada, N., Ohgi, T., Goto, T. & Nishimura, S. (1980). Transfer ribonucleic acid guanine transglycosylase isolated from rat liver. *Biochemistry* **19**(2), 395-400.
- Short, S. A., Armstrong, S. R., Ealick, S. E. & Porter, D. J. (1996). Active site amino acids that participate in the catalytic mechanism of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase. *J Biol Chem* **271**(9), 4978-87.
- Silverman, R. B. (1992). *Medizinische Chemie für Organiker, Biochemiker und Pharmazeutische Chemiker.*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo.
- Slany, R. K., Bosl, M., Crain, P. F. & Kersten, H. (1993). A new function of S-adenosylmethionine: the ribosyl moiety of AdoMet is the precursor of the cyclopentenediol moiety of the tRNA wobble base queuine. *Biochemistry* **32**(30), 7811-7.
- Slany, R. K. & Kersten, H. (1994). Genes, enzymes and coenzymes of queuosine biosynthesis in procaryotes. *Biochimie* **76**(12), 1178-82.
- Sprague, P. W. (1995). Automated chemical hypothesis generation and database searching with CATALYST. *Perspect. Drug Discov. Des.* **3**, 1-20.
- SYBYL. (1999). Molecular modelling software 6.6 edit. Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, Suite 303, St. Louis MO 63144.
- Tobe, T., Nagai, S., Okada, N., Adler, B., Yoshikawa, M. & Sasakawa, C. (1991). Temperature-regulated expression of invasion gened in *Shigella flexneri* is controlled through the transcriptional activation of the *virB* gene on the large plasmid. *Mol. Microbiol.* **5**, 887-893.
- Tran Van Nhieu, G., Ben-Ze'ev, A. & Sansonetti, P. J. (1997). Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the Shigella IpaA invasin. *EMBO J* **16**(10), 2717-29.
- UNITY. (2000). Chemical Information Software 4.1.1 edit. Tripos Inc., St. Louis, MO.
- Verlinde, C. L. & Hol, W. G. (1994). Structure-based drug design: progress, results and challenges. *Structure* **2**(7), 577-87.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(2), 615-9.

- von Itzenstein, M., Dyason, J. C., Oliver, S. W., White, H. F., Wu, W. Y., Kok, G. B. & Pegg, M. S. (1996). A study of the active site of influenza virus sialidase: an approach to the rational design of novel antiinfluenza drugs. *J. Med. Chem.* **39**, 388-391.
- Ward, L. W. (1985). Measurement of Ligand Binding to Proteins by Fluorescence Spectroscopy. *Methods Enzymol.* **117**, 400-414.
- Wegler, R. (1937). Chemiluminescenz cyclischer Hydrazide. *J. prakt. Chem.* **148**, 135ff.
- Welch, W., Ruppert, J. & Jain, A. N. (1996). Hammerhead: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites. *Chem Biol* **3**(6), 449-62.
- Westhead, D. R. & Thornton, J. M. (1998). Protein structure prediction. *Curr Opin Biotechnol* **9**(4), 383-389.
- Yokoyama, S. T., Miyazawa, T., Iitaka, Y., Yamaizumi, Z., Kasai, H. & Nishimura, S. (1979). Three-dimensional structure of hypermodified nucleoside Q located in the wobble position of tRNA. *Nature* **282**., 107-109.
- Zyklinsky, A., Prevost, M. C. & Sansonetti, P. J. (1992). *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* **358**., 167-169.

Danksagungen

- Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe für die interessante Themenstellung, für die freundliche Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft. Das Interesse und die Motivation haben sehr zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen.
- Dr. Klaus Reuter und Dr. Ralf Ficner danke ich für die Einführung in die biochemischen und kristallographischen Arbeitstechniken sowie für ihr stetiges wissenschaftliches Interesse und Förderung dieser Arbeit.
- Ein besonderer Dank geht an Hans-Dieter Gerber für die herausragende und zuverlässige Durchführung und Unterstützung der synthetischen Arbeiten.
- Dr. Milton T. Stubbs danke ich für die Unterstützung des kristallographischen Teils dieser Arbeit und für die hervorragende (heitere) Arbeitsatmosphäre.
- Dr. George Garcia danke ich für die Ermöglichung eines 6-wöchigen Aufenthalts am College of Pharmacy, University of Michigan/USA. Besonderer Dank geht dabei auch an DeeAnne Goodenough-Lashua für die Einarbeitung in den Enzymassay der TGT und die Versorgung mit tRNA.
- Prof. Dr. George Sheldrick und Fabio Dall'Antonia (Universität Göttingen) danke ich für die Benutzung des Röntgendiffraktometers.
- Christian Sohn danke ich für die Betreuung des Röntgendiffraktometers und des biochemischen Labors.
- Dr. Sabine Reyda, Dr. Klaus Reuter, Dr. Milton T. Stubbs, Ruth Brenk, Sven Grüneberg, Oliver Krämer und Nicole Rössel danke ich für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit.
- Marco Bocola, Markus Böhm, Holger Gohlke und Stefan Schmitt danke ich für einsatzbereite Rechner und die Systemadministration.
- Sven Grüneberg danke ich für die Einführung in FlexX und die gute, stimmungsvolle Zusammenarbeit.
- Ein Dank geht auch an Frank Dullweber für die Einführung in die pK_a -Wert Messungen.
- Allen Arbeitskreis-Mitgliedern danke ich für das angenehme Arbeitsklima.
- Der größte Dank geht schließlich an meine Eltern für die fortwährende Unterstützung und Aufmunterung während des Studiums und der Doktorarbeit.

Veröffentlichungen

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Publikationen, Posterbeiträge und Vorträge hervorgegangen:

- **Grädler, U., Klebe, G.**
tRNA-Guanine Transglycosylase: A Target for *de novo*-Design of Inhibitors against the Dysentery-causing Bacterium *Shigella flexneri*.
Poster, First European Graduate Student Meeting, Frankfurt/Main (1998).
- **Grädler, U., Klebe, G.**
tRNA-Guanine Transglycosylase: A Target for *de novo*-Design of Inhibitors against the Dysentery-causing Bacterium *Shigella flexneri*.
Poster, 12. Frühjahrs-Workshop Molecular Modelling, TU Darmstadt (1998).
- **Grimm, C., Grädler, U., Klebe, G., Ficner, R., Reuter, K.**
Enzymes involved in the Biosynthesis of the Modified tRNA Nucleoside Queuosine as Targets for the Design of Drugs against Shigellosis.
Poster, VAAM Tagung, Universität Göttingen, (1999).
- **Grimm, C., Grädler, U., Klebe, G., Ficner, R., Reuter, K.**
Enzymes involved in the Biosynthesis of the Modified tRNA Nucleoside Queuosine as Targets for the Design of Drugs against Shigellosis.
Poster, Deutsche Gesellschaft für Kristallographie, Symposium on protein structure analysis for biomedical research, Murnau, (1999).
- **U. Grädler, R. Ficner, G.A. Garcia, M.T. Stubbs, G. Klebe and K. Reuter**
Mutagenesis and Crystallographic Studies of *Zymomonas mobilis* tRNA-Guanine Transglycosylase to Elucidate the Role of Serine 103 for Enzymatic Activity.
FEBS-Letters 454 (1999) 142-146

-
- **Grädler, U., Reuter, K., Ficner, R., Klebe, G.**
The X-ray structure of tRNA-Guanine Transglycosylase in Complex with 4-Aminophthalhydrazide: Implications for the *de novo*-Design of Antibiotics against the Dysentery-causing Bacterium *Shigella flexneri*.
Vortrag, 13. Frühjahrs-Workshop Molecular Modelling, TU Darmstadt (1999).
 - **G. Klebe, M. Böhm, F. Dullweber, U. Grädler, H. Gohlke, M. Hendlich.**
Structural and Energetic Aspects of Protein-Ligand Binding in Drug Design
in "*Molecular Modelling and Prediction of Bioactivity*", Ed. K. Gundertofte and F. Jorgensen, KLUWER Academic /Plenum Publ., New York, (2000), p. 103 - 110
 - **G. Klebe, U. Grädler, S. Grüneberg, O. Krämer, H. Gohlke.**
Understanding Receptor-Ligand Interactions as a Prerequisite for Virtual Screening
In "*Virtual Screening for Bioactive Molecules*", Eds. H.J. Böhm, S. Schneider, Wiley-VCH, Weinheim (2000) in press
 - **Grädler, U., Grimm, C., Klebe, G., Ficner, R., Reuter, K.**
New Targets for the Rational Design of Drugs against Shigellosis: tRNA-Guanine Transglycosylase and QueA.
Poster, Deutsche Gesellschaft für Kristallographie, Symposium on protein structure analysis for biomedical research, Murnau, (2000).
 - **Grädler, U., Grimm, C., Klebe, G., Ficner, R., Reuter, K.**
New Targets for the Rational Design of Drugs against Shigellosis: tRNA-Guanine Transglycosylase and QueA.
Poster, 14. Frühjahrs-Workshop Molecular Modelling, TU Darmstadt (2000).

Lebenslauf

13.07.1971	Geboren in Halle/Westfalen
1977-1981	Grundschule Hörste
1981-1987	Realschule Halle/Westf.
1987-1990	CJD-Gymnasium Versmold
29.05.1990	Abschluß des Gymnasiums mit der Allgemeinen Hochschulreife
1990-1991	Zivildienst, Haus am Laibach, Halle/Westf.
Okt. 1991	Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Bielefeld
07.07.1993	Vordiplom Chemie
Okt.1993	Fortsetzung des Studiums der Chemie an der Philipps-Universität Marburg
WS 1994/1995	Studienaufenthalt an der Heriot-Watt University Edinburgh/Schottland
Mai 1996-Jan.1997	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Arbeitsgruppe Dr. Ullrich Thema: „DNA-Bindungsstudien mit dem transkriptionellen Aktivatorprotein CorR in <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> “
28.01.1997	Studienabschluß als Diplom-Chemiker
15.04.1997	Beginn der Promotion unter Leitung von Prof. Dr. G. Klebe am Institut für pharmazeutische Chemie und Biochemie der Philipps-Universität Marburg
seit 15.04.1997	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für pharmazeutische Chemie und Biochemie; Betreuung des Studentenpraktikums „Qualitative Anorganische und Analytische Chemie“ (1. Semester)

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation „***De novo-Design und Strukturbestimmung von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase aus *Zymomonas mobilis* als neues Target der Bakterienruhr***“ selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den _____

(Unterschrift)